



**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**  
Facultad de Ingeniería  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

**Implementación de un sistema de medición de velocidad con aplicación en microfluidos basado en el uso de pinzas ópticas.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ingeniería Mecánica

Presenta:

Ing. Pedro Almendarez Rangel

Asesor:

Dr. Francisco Gerardo Pérez Gutiérrez

Co-asesora:

Dra. Beatriz Morales Cruzado

San Luis Potosí, S. L. P.

Febrero de 2017





Universidad Autónoma  
de San Luis Potosí

20 de octubre de 2016

**AL ING. PEDRO ALMENDÁREZ RANGEL  
P R E S E N T E.**

En atención a su solicitud de Temario, presentada por los **Dres. Francisco Gerardo Pérez Gutiérrez y Beatriz Morales Cruzado Asesor y Co-asesora** de la Tesis que desarrollará Usted, con el objeto de obtener el Grado de **Maestro en Ingeniería Mecánica**, me es grato comunicarle que en la Sesión del H. Consejo Técnico Consultivo celebrada el día 20 de octubre del presente, fue aprobado el Temario propuesto:

**TEMARIO:**

**“Implementación de un sistema de medición de velocidad con aplicación en microfluidos basado en el uso de pinzas ópticas”**

i

Introducción.

1. Técnicas de velocimetría en microfluidos.
2. Pinzas ópticas como herramienta para medir velocidad en microfluidos.
3. Implementación del sistema de medición de velocidad.
4. Determinación del perfil de velocidad al interior de un microcanal.

Conclusiones.

Apéndices.

Referencias.

**“MODOS ET CUNCTARUM RERUM MENSURAS AUDEBO”**

**A T E N T A M E N T E**

**M. I. JORGE ALBERTO PÉREZ GONZÁLEZ  
DIRECTOR.**



**FACULTAD DE  
INGENIERÍA**

Av. Manuel Nava 8  
Zona Universitaria - CP 78290  
San Luis Potosí, S.L.P.  
tel. (444) 826 2330 al39  
fax (444) 826 2336  
www.uaslp.mx

Copia. Archivo.  
\*etn.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE INGENIERÍA

Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

### Aclaración

El presente trabajo que lleva por título

“Implementación de un sistema de medición de velocidad con aplicación en microfluidos basado en el uso de pinzas ópticas”

se realizó en el periodo de enero de 2015 a enero de 2017 bajo la dirección del Dr. Francisco Gerardo Pérez Gutiérrez y la Dra. Beatriz Morales Cruzado.

### Originalidad

Por este medio aseguro que he realizado este documento de tesis para fines académicos sin ayuda indebida de terceros y sin utilizar otros medios más que los indicados.

Las referencias e información tomadas directa o indirectamente de otras fuentes se han definido en el texto como tales y se ha dado el debido crédito a las mismas.

El autor exime a la UASLP de las opiniones vertidas en este documento y asume la responsabilidad total del mismo.

Este documento no ha sido sometido como tesis a ninguna otra institución nacional o internacional en forma parcial o total.

Se autoriza a la UASLP para que divulgue este documento de Tesis para fines académicos.

Pedro Almendarez Rangel

---

# Agradecimientos

*Agradezco mucho a mis asesores, la Dra. Beatriz Morales Cruzado y el Dr. Francisco Gerardo Pérez Gutiérrez, por su ardua labor y el tiempo empleado en asesorías y revisiones, así como por la confianza que depositaron en mí para realizar este trabajo. Gracias Dra. Beatriz por la gran atención y tiempo dedicado en el laboratorio. A ambos, les agradezco aún más por tomar en cuenta en todo momento mis opiniones y puntos de vista, que es de lo mejor que un estudiante puede recibir de sus asesores.*

*Gracias al Dr. Braulio Gutiérrez Medina, quien ha seguido muy de cerca la evolución de este trabajo y ha brindado retroalimentación invaluable. Gracias por la gran disposición mostrada desde el principio.*

*También agradezco al comité que ha dado seguimiento a este trabajo al interior del Posgrado en Ingeniería Mecánica: Dr. Francisco Oviedo Tolentino, Dra. Geydy Luz Gutiérrez Ureta, Dr. Mauro Eduardo Maya Méndez. Su interés y comentarios han sido importantes para el desarrollo de esta tesis.*

*Gracias al Dr. Ricardo Romero Méndez, quien contribuyó a este trabajo de manera fundamental al participar en el planteamiento de la idea inicial.*

*Mis más amplios agradecimientos para el Dr. Erick Sarmiento Gómez, quien con sus conocimientos y experiencia brindó una ayuda excepcional en el desarrollo de este trabajo.*

*Gracias al Dr. José Luis Arauz Lara y al Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza por el equipo facilitado a través del Laboratorio de Fluidos Complejos del Instituto de Física de la UASLP. También a la Dra. María de los Ángeles Ramírez Saíto por su ayuda en la construcción de microcanales.*

*Agradezco también a la Red de Materia Condensada Blanda del CONACyT por el apoyo otorgado para la compra de materiales.*

*Mis más sinceros agradecimientos a la sociedad mexicana, quien por medio del CONACyT me otorgó la beca que hizo posible realizar estudios de maestría.*

# Dedicatoria

*Y Daniel habló y dijo: Sea bendito el nombre de Dios de siglos en siglos, porque suyos son el poder y la sabiduría. Él muda los tiempos y las edades; quita reyes, y pone reyes; da la sabiduría a los sabios, y la ciencia a los entendidos. El revela lo profundo y lo escondido; conoce lo que está en tinieblas, y con él mora la luz. A ti, oh Dios de mis padres, te doy gracias y te alabo, porque me has dado sabiduría y fuerza...*

*Daniel 2.20-23*

*A mis padres Laura Rangel García y Pedro Almendarez Hernández. Porque me han ofrecido lo mejor de cada uno, haciéndome sentir un orgullo que me inspira a dar lo mejor que tengo en todo lo que hago. Les debo todo. Los amo.*

*A mis hermanos: Laura, Antonio, Mónica y Moisés. Son parte fundamental de mi vida.*

*A los grandes mexicanos que a lo largo de la historia de mi país han contribuido a su desarrollo, los cuales, por fortuna son tantos que no tengo espacio suficiente para mencionarlos. Trataré de honrarlos de la mejor manera a través de mis acciones.*

# Contenido

Introducción .....	1
<b>Capítulo 1: Técnicas de velocimetría en microfluidos .....</b>	<b>4</b>
1.1 Anemometría laser Doppler.....	4
1.2 Velocimetría por imágenes de partículas .....	9
1.3 Velocimetría por seguimiento de partículas.....	14
1.4 Método de comparación-validación propuesto .....	16
<b>Capítulo 2: Pinzas ópticas como herramienta para medir velocidad en microfluidos .....</b>	<b>18</b>
2.1 Fuerzas de atrapamiento .....	18
2.2 Pinzas ópticas y microvelocimetría .....	21
2.2.1 Medición conceptual de velocidad con pinzas ópticas.....	21
2.2.2 Antecedentes del uso de pinzas ópticas en microvelocimetría.....	23
2.3 Métodos de obtención de parámetros experimentales .....	25
2.3.1 Métodos para obtener la constante de rigidez $k$ de una pinza óptica.....	26
2.3.1.1 Método de equipartición .....	26
2.3.1.2 Método basado en la distribución de Boltzmann.....	27
2.3.1.3 Método de fuerza de arrastre.....	27
2.3.2 Métodos para obtener el factor de calibración $\beta$ de un fotodetector de cuadrante.....	28
2.3.2.1 Método de partícula “pegada” .....	28
2.3.2.2 Método de arrastre.....	28
2.3.3 Métodos para obtener $k$ y $\beta$ simultáneamente .....	30
2.3.3.1 Método propuesto por Allersma y colaboradores .....	31
2.3.3.2 Método propuesto por Berg-Sørensen y colaboradores.....	32
2.3.3.3 Método propuesto por Tolić-Nørrelykke y colaboradores .....	33
2.3.3.4 Método basado en filtros digitales .....	35
<b>Capítulo 3: Implementación del sistema de medición de velocidad .....</b>	<b>37</b>
3.1 Arreglo experimental .....	37
3.2 Metodología experimental .....	39
3.3 Procesamiento de datos experimentales .....	42
3.3.1 Obtención de $k$ mediante el teorema de equipartición .....	42

3.3.2 Obtención de $k$ y $\beta$ con el método propuesto por Berg-Sørensen y colaboradores .....	42
3.3.3 Obtención de $k$ y $\beta$ mediante el método basado en filtros digitales .....	45
3.3.4 Obtención de $\beta$ mediante el método de arrastre.....	46
3.3.5 Obtención de $\beta$ con el método propuesto por Tolić-Nørrelykke y colaboradores .....	48
3.3.6 Medición de velocidad .....	48
3.3.7 Cálculo de velocidad teórica .....	49
3.3.8 Propagación del error .....	49
<b>Capítulo 4: Determinación del perfil de velocidad al interior de un microcanal .....</b>	<b>51</b>
4.1 Parámetros de la pinza óptica en función de la potencia a profundidad constante .....	51
4.2 Medición de velocidad en función de la profundidad .....	54
4.3 Medición de velocidad en función del caudal a profundidad constante.....	61
4.4 Comportamiento de $\beta$ en función de la profundidad con nuevo arreglo experimental.....	62
4.5 Trabajo a futuro .....	65
<b>Conclusiones .....</b>	<b>66</b>
<b>Apéndice A: Fuerzas de atrapamiento en el régimen de Rayleigh .....</b>	<b>68</b>
<b>Apéndice B: Método de detección en el plano focal posterior .....</b>	<b>71</b>
<b>Apéndice C: Circuito de amplificación y filtrado antialias .....</b>	<b>73</b>
<b>Apéndice D: Determinación de la densidad espectral de potencia de una señal por medio de filtros digitales .....</b>	<b>75</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>83</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Principio básico de la anemometría láser Doppler (ALD) .....	5
<b>Figura 1.2</b> Configuración de doble haz para la ALD. ....	6
<b>Figura 1.3</b> Patron de interferencia generado en la ALD .....	7
<b>Figura 1.4</b> Configuración de doble haz para la ALD (cada haz con frecuencia diferente) .....	8
<b>Figura 1.5</b> Esquema de la estimación del desplazamiento de una ventana de interrogación en velocimetría por imágenes de partículas (VIP) .....	10
<b>Figura 1.6</b> Esquema de formación del plano de correlación en VIP .....	11
<b>Figura 1.7</b> Cálculo de la función de correlación cruzada para un ejemplo real de VIP .....	11
<b>Figura 2.1</b> Comportamiento de dos rayos típicos que forman parte de un haz láser altamente enfocado y que inciden sobre una partícula con índice de refracción mayor al del medio .....	19
<b>Figura 2.2</b> Fuerzas producidas sobre una partícula que se encuentra en medio de un gradiente de intensidad .....	20
<b>Figura 2.3</b> Fuerza de gradiente, de esparcimiento y total ejercidas por una pinza óptica (PO) en la dirección axial y transversal, calculadas mediante óptica geométrica.....	21
<b>Figura 2.4</b> Desplazamiento de la posición promedio de una partícula como efecto de la fuerza de arrastre de un fluido .....	22
<b>Figura 2.5</b> Desplazamiento de una partícula atrapada producido por el movimiento de la muestra al implementar el método de arrastre para determinar el factor de calibración de un fotodetector de cuadrante (FDC) .....	29
<b>Figura 2.6</b> Desplazamiento de una partícula atrapada a diferentes velocidades de traslación de la muestra para determinar el factor de calibración de un FDC mediante el método de arrastre .....	29
<b>Figura 2.7</b> Meseta observada al multiplicar la densidad espectral de potencia experimental por el cuadrado de la frecuencia.....	32
<b>Figura 2.8</b> Relación entre la curva de densidad de varianza y la curva construida con las varianzas de la señal original filtrada con un filtro sintonizado a frecuencias crecientes.....	35
<b>Figura 3.1</b> Esquema del arreglo utilizado en la realización de mediciones de velocidad.....	38
<b>Figura 3.2</b> Esquema de la orientación del microcanal durante la realización de experimentos.....	38
<b>Figura 3.3</b> Esquema de la organización de los experimentos realizados. ....	39
<b>Figura 3.4</b> Esquema de los métodos de medición de velocidad y determinación de parámetros característicos de la pinza óptica implementados experimentalmente.....	41
<b>Figura 3.5</b> Interfaz del programa desarrollado por Tolić-Nørrelykke y colaboradores para obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Berg-Sørensen y colaboradores (ajustes y opciones habilitadas para partículas de 1 $\mu\text{m}$ ).....	43
<b>Figura 3.6</b> Interfaz del programa desarrollado por Tolić-Nørrelykke y colaboradores para obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Berg-Sørensen y colaboradores (ajustes y opciones habilitadas para partículas de 0.5 $\mu\text{m}$ )....	44
<b>Figura 3.7</b> Magnitud de la respuesta de los filtros a la frecuencia para el procesamiento de datos provenientes del atrapamiento de partículas de 1 $\mu\text{m}$ .....	46
<b>Figura 3.8</b> Posición de una partícula atrapada al hacer oscilar la muestra durante la implementación del método de arrastre para obtener el factor de calibración del FDC.....	47



<b>Figura 3.9</b> Comportamiento del desplazamiento promedio de una partícula de 1 $\mu\text{m}$ atrapada a una profundidad de 16 $\mu\text{m}$ durante la implementación del método de arrastre para obtener el factor de calibración del FDC .....	<b>47</b>
<b>Figura 3.10</b> Consideraciones habilitadas y valor de los parámetros de ajuste utilizados típicamente para la obtención del factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Tolić-Nørrelykke y colaboradores.....	<b>48</b>
<b>Figura 4.1</b> Constante de rigidez de la PO en cada dirección en función de la potencia a la salida del láser para partículas de 1 $\mu\text{m}$ .....	<b>51</b>
<b>Figura 4.2</b> Constante de rigidez de la PO en cada dirección en función de la potencia a la salida del láser para partículas de 0.5 $\mu\text{m}$ . .....	<b>52</b>
<b>Figura 4.3</b> Factor de calibración del FDC en función de la potencia a las salida del láser para partículas de 1 $\mu\text{m}$ .....	<b>53</b>
<b>Figura 4.4</b> Factor de calibración del FDC en función de la potencia a las salida del láser para partículas de 0.5 $\mu\text{m}$ .....	<b>54</b>
<b>Figura 4.5</b> Factor de calibración del FDC en cada dirección como función de la profundidad para una partícula de 1 $\mu\text{m}$ .....	<b>55</b>
<b>Figura 4.6</b> Distribución de posición de una partícula de 1 $\mu\text{m}$ de diámetro atrapada a 8 $\mu\text{m}$ de profundidad al ser observada con FDC.....	<b>56</b>
<b>Figura 4.7</b> Distribución de posición de una partícula de 1 $\mu\text{m}$ de diámetro, atrapada a 8 $\mu\text{m}$ de profundidad al ser observada con cámara. ....	<b>56</b>
<b>Figura 4.8</b> Factor de calibración del FDC en cada dirección como función de la profundidad para una partícula de 0.5 $\mu\text{m}$ .....	<b>57</b>
<b>Figura 4.9</b> Constante de rigidez de la PO en cada dirección como función de la profundidad para una partícula de 1 $\mu\text{m}$ .....	<b>58</b>
<b>Figura 4.10</b> Constante de rigidez de la PO en cada dirección como función de la profundidad para una partícula de 0.5 $\mu\text{m}$ .....	<b>58</b>
<b>Figura 4.11</b> Velocidad como función de la profundidad a diferentes caudales y tamaños de partícula .....	<b>60</b>
<b>Figura 4.12</b> Velocidad como función del caudal para dos diferentes tamaños de partícula .....	<b>62</b>
<b>Figura 4.13</b> Factor de calibración del FDC como función de la profundidad para una partícula de 1 $\mu\text{m}$ (arreglo experimental modificado).....	<b>63</b>
<b>Figura 4.14</b> Distribución de posición de una partícula de 1 $\mu\text{m}$ de diámetro atrapada a 10.5 $\mu\text{m}$ de profundidad al ser observada con FDC (arreglo experimental modificado).....	<b>63</b>
<b>Figura 4.15</b> Factor de calibración del FDC como función de la profundidad para una partícula de 1 $\mu\text{m}$ (apertura del iris anterior al objetivo de atrapamiento modificada) .....	<b>64</b>
<b>Figura 4.16</b> Distribución de posición de una partícula de 1 $\mu\text{m}$ de diámetro atrapada a 10.5 $\mu\text{m}$ de profundidad al ser observada con FDC (apertura del iris anterior al objetivo de atrapamiento modificada) .....	<b>64</b>
<b>Figura 4.17</b> Constante de rigidez de la PO como función de la profundidad para una partícula de 1 $\mu\text{m}$ (apertura del iris anterior al objetivo de atrapamiento modificada) .....	<b>65</b>
<b>Figura A.1</b> Fuerzas ejercidas sobre una partícula en dirección transversal y axial.....	<b>70</b>
<b>Figura B.1</b> Fotodetector de cuadrante PDQ80A de Thorlabs. ....	<b>72</b>
<b>Figura B.2</b> Configuración mediante la que la imagen del PFP de condensador es llevada a la superficie activa del fotodetector de cuadrante en el método de detección en el plano focal posterior (DPFP).....	<b>72</b>
<b>Figura C.1</b> Ilustración esquemática del fenómeno de alias. ....	<b>73</b>
<b>Figura C.2</b> Circuito de amplificación y filtrado antialias. ....	<b>74</b>
<b>Figura D.1</b> Respuesta a la frecuencia de la magnitud y la fase de un filtro ideal .....	<b>80</b>

**Figura D.2** Densidad espectral de potencia esperada en una señal cuya potencia está equitativamente distribuida sobre todas las frecuencias muestreadas..... **80**

**Figura D.3** Respuesta a la frecuencia de la magnitud y la fase de un filtro digital real..... **81**

# Introducción

Con el interés de producir reacciones químicas en dispositivos de tamaño micrométrico conocidos en inglés como *lab-on-a-chip*, ha sido necesario inducir y medir flujos en el interior de los microcanales que componen a dichos dispositivos. Esto es: se ha creado la necesidad de medir velocidad en flujos con resolución espacial del orden de un micrómetro y cuya magnitud sea del orden de un micrómetro por segundo. Para cubrir dicha necesidad, varias técnicas de velocimetría bien estudiadas a escala macroscópica han sido adaptadas a la microescala. Ejemplos de dichas técnicas son la micro-anemometría láser-Doppler (micro-ALD) (Büttner *et al.* 2006; Czarske y Büttner 2008; König *et al.* 2010), la micro-velocimetría por imágenes de partículas (micro-VIP) (Bown *et al.* 2006; Meinhart *et al.* 2000) y la micro-velocimetría por seguimiento de partículas (micro-VSP) (Bown *et al.* 2006; Sato *et al.* 2003). Sin embargo, al medir velocidad en un flujo a microescala utilizando para ello partículas suspendidas en el fluido debe considerarse la posible influencia del movimiento Browniano en las mediciones. El movimiento Browniano es un movimiento aleatorio inducido sobre las partículas suspendidas como consecuencia de la energía térmica del fluido que produce un error sobre las mediciones de velocidad, el cual se caracteriza por ser mayor entre menor sea la velocidad del flujo medido o el tamaño de las partículas usadas (Capítulo 8 de Raffel *et al.* (2013)).

Para evitar el error asociado al movimiento Browniano se ha propuesto en la literatura realizar un promedio de las mediciones hechas con las técnicas adaptadas de la escala macroscópica, planteándose un promedio temporal en el caso de la micro-VIP (Meinhart *et al.* 2000) y uno espacial en el caso de la micro-VSP (Sato *et al.* 2003). Para que el promedio espacial propuesto en el caso de la micro-VSP elimine la influencia del movimiento Browniano en las mediciones y se conserve una resolución espacial que no supere varios micrómetros, es necesario que se utilicen altas concentraciones de partículas de varios cientos de nanómetros de diámetro como máximo (Sato *et al.* 2003). Por otro lado, debido al algoritmo de procesamiento de imágenes en el que la micro-VIP está basada es necesario usar concentraciones y tamaños de partículas similares a los usados en micro-VSP (Meinhart *et al.* 2000). Por un lado, las altas concentraciones de partículas pueden causar un mal funcionamiento en los dispositivos dentro de los que se realiza la medición o una distorsión del flujo (Eom *et al.* 2014). Por otro lado, al utilizar partículas de unos cuantos cientos de nanómetros de diámetro es necesario utilizar sistemas de iluminación y de microscopía más complejos que los utilizados para observar partículas con diámetros del orden de 1  $\mu\text{m}$  (Meinhart *et al.* 2000). Además, aunque las técnicas mencionadas son efectivas para eliminar el error asociado al movimiento Browniano en las mediciones, con ellas difícilmente se pueden alcanzar resoluciones espaciales mejores que un par de micrómetros (Capítulo 8 de Raffel *et al.* (2013)). Con respecto a la micro-ALD, ésta es una técnica con la que, a pesar de lograr mediciones de hasta tres componentes de velocidad con resolución espacial incluso submicrométrica, es muy difícil la detección de magnitudes en el orden de los micrómetros por segundo (Büttner *et al.* 2006; König *et al.* 2010; Yoshida 2008).

Una pinza óptica (PO) puede definirse como un potencial producido por un haz láser altamente enfocado que tiene la capacidad de atrapar en una región tridimensional a una partícula con índice refracción mayor al del medio en que se encuentra suspendida (Ashkin 1986). De la observación de la posición de una partícula atrapada en una PO puede obtenerse la velocidad de un flujo en los alrededores de dicha partícula (Eom *et al.* 2014). El uso de una PO para medir velocidad representa una alternativa atractiva toda vez que, como se pretende demostrar con este trabajo, con esta técnica es posible mantener una resolución espacial incluso submicrométrica y disminuir considerablemente la influencia del movimiento Browniano en las mediciones de velocidad. Lo anterior es de gran relevancia puesto que existen micro-bombas propuestas como solución a las necesidades de flujo en dispositivos *lab-on-a-chip* que producen flujos con velocidades para las que la influencia del movimiento Browniano es grande al emplear tamaños de partículas como los usados en micro-VIP y micro-VSP (Ladavac and Grier 2004; Leach *et al.* 2006; Terray *et al.* 2002).

Para medir velocidad con una PO, se puede emplear videomicroscopía, usando una cámara de video, o detección en el plano focal posterior, auxiliándose de un fotodetector de cuadrante (FDC). Sin embargo, al utilizar un FDC el sistema de medición tiene características que hacen especialmente atractivo el uso de una PO: 1) la posibilidad de obtener tres componentes de velocidad y 2) la posibilidad de medir velocidad y temperatura simultáneamente, aunque ninguna de las dos ha sido reportada a la fecha.

Aunque se ha reportado el uso de PO para medir velocidad (Di Leonardo *et al.* 2006; Eom *et al.* 2014; Knöner *et al.* 2005; Mushfique *et al.* 2008), viscosidad (Buosciolo *et al.* 2004; Nemet *et al.* 2002; Pesce *et al.* 2005) o ambas (Nemet *et al.* 2002b), en la mayoría de los casos esto ha sido únicamente con la finalidad de posicionar una partícula en el punto donde se desea hacer la medición por medio de micro-VSP (Di Leonardo *et al.* 2006; Knöner *et al.* 2005; Mushfique *et al.* 2008) o bien, se ha evitado el uso de la constante de rigidez de la pinza en la medición de velocidad (Knöner *et al.* 2005), limitando la versatilidad del método y su capacidad para la medición de otras magnitudes como la temperatura. Por otro lado, aunque recientemente se reportó el uso de una PO para medir velocidad en un microcanal a través de su constante de rigidez y de la ley de Stokes (Eom *et al.* 2014), tanto la capacidad de medición de tres componentes de velocidad como de medición de velocidad y temperatura de forma simultánea siguen sin ser exploradas. Lo anterior hace de las PO's una herramienta de velocimetría no totalmente desarrollada sobre la que es necesario realizar mayor investigación para aprovechar el potencial que tiene para ser aplicada en estudios novedosos, por ejemplo, de transferencia de calor a microescala. En ese sentido, el presente trabajo pretende dar un primer paso hacia dichas aplicaciones novedosas de las PO's al reportar su empleo en la medición de velocidad a diferentes profundidades de un microcanal rectangular utilizando el concepto de constante de rigidez de la PO y la Ley de Stokes, empleando como métodos de observación la videomicroscopía y la detección en el plano focal posterior, y comparando las mediciones hechas con PO con aquellas obtenidas mediante micro-VSP promediada temporalmente con los objetivos de validar el sistema de medición basado en PO y

evidenciar las ventajas que éste tiene. También se comparan los resultados obtenidos usando la técnica basada en PO con los predichos teóricamente.

Este trabajo se encuentra organizado de la siguiente manera:

En el [Capítulo 1](#) se presenta el marco teórico necesario para entender tres de las técnicas de velocimetría macroscópicas más relevantes (ALD, VIP y VSP), los desafíos y limitaciones a los que estas técnicas se enfrentan al ser adaptadas a la escala micrométrica y los antecedentes de uso de estas técnicas en microfluidos.

En el [Capítulo 2](#) se expone la teoría con la que se modela el fenómeno de PO; dicha teoría sustenta su uso para la medición de velocidad. Además, se provee del contexto en el que se encuentra el uso de las pinzas ópticas en la medición de velocidad a través de los trabajos que a la fecha se han reportado en la literatura. Por último, se exponen los diferentes métodos con los que es posible obtener los parámetros experimentales necesarios para realizar las mediciones de velocidad por medio de PO.

En el [Capítulo 3](#) se hace una descripción detallada del arreglo experimental utilizado en la implementación del sistema de velocidad basado en el uso de una PO, así como de la metodología seguida en la realización de los experimentos y en el procesamiento de los datos correspondientes.

En el [Capítulo 4](#) se presentan y discuten los resultados obtenidos al utilizar el sistema de medición basado en PO implementado para observar el perfil de velocidad en un flujo inducido al interior de un microcanal, haciendo especial énfasis en la física involucrada en el fenómeno.

Por último, se exponen las [Conclusiones](#) a las que se ha llegado con la realización de este trabajo y se proponen las direcciones que podrían seguirse para darle continuidad a esta línea de investigación.

En los apéndices se proporciona información adicional a la contenida en el cuerpo de este trabajo con la intención de brindar al lector un panorama un poco más amplio sin disminuir la agilidad de la lectura. El [Apéndice A](#) amplía la información sobre la interacción entre un haz láser y una partícula dieléctrica, con la intención de resaltar los parámetros que juegan un papel relevante en la determinación de las fuerzas producidas en una PO. El [Apéndice B](#) explica el funcionamiento de un FDC así como las características del sistema óptico necesario para su utilización. En el [Apéndice C](#) se explica lo que es el fenómeno de alias, cómo es que por medio de filtros análogos dicho fenómeno puede evitarse, así como los circuitos específicos utilizados en este trabajo con la intención de evitar dicho fenómeno. En el [Apéndice D](#) se proporciona la justificación a un novedoso método propuesto en este trabajo para la determinación simultánea de los parámetros experimentales necesarios para la medición de velocidad por medio de una PO.

# Capítulo 1: Técnicas de velocimetría en microfluidos

De la necesidad de inducir flujos en microcanales se ha derivado también la necesidad de medir velocidad al interior de dichos flujos. Por lo tanto, las técnicas de velocimetría tradicionales han sido adaptadas a la escala micrométrica, sin embargo, presentan complicaciones y limitaciones cuando interesa medir velocidades bajo las que existe una gran influencia del movimiento Browniano y se requiere una resolución espacial submicrométrica. En las primeras tres secciones de este Capítulo se explican dichas técnicas tradicionales, las adaptaciones necesarias para aplicarlas a la microescala y la razón de sus limitaciones y dificultades al utilizarse en microfluidos. También se brindan los antecedentes que existen en cuanto a la aplicación de estas técnicas en microfluidos.

Las primeras tres secciones sirven además para justificar el método propuesto en la [Sección 1.4](#) como método de comparación-validación del sistema basado en una pinza óptica (PO).

## 1.1 Anemometría láser Doppler

La anemometría láser Doppler (ALD) es una técnica de velocimetría que permite obtener mediciones puntuales de hasta tres componentes de velocidad, aunque con su configuración más simple mide solamente una. La ALD se basa en el efecto Doppler que se presenta cuando una fuente emite una onda de luz al mismo tiempo que se mueve respecto a un observador fijo, de tal manera que la luz emitida por dicha fuente tiene una frecuencia diferente a la percibida por el observador. La frecuencia que es percibida por el observador está dada en la Ecuación 1.1 (Zhang 2010).

$$\nu_1 = \nu_0 \left( 1 + \frac{\vec{u}_f \cdot \vec{l}}{c} \right). \quad (1.1)$$

En la Ecuación 1.1  $\nu_1$  es la frecuencia percibida por el observador,  $\nu_0$  es la frecuencia a la que emite la fuente,  $\vec{u}_f$  es la velocidad de la fuente,  $\vec{l}$  es un vector unitario situado en la fuente con dirección hacia el observador fijo, y  $c$  es la velocidad de la luz en el medio donde se mueve la fuente.

De igual manera, puede existir una diferencia entre la frecuencia que, según un observador móvil, tiene la luz emitida por una fuente fija y la frecuencia a la que realmente emite dicha fuente. La frecuencia que es percibida por el observador está dada por la Ecuación 1.2 (Zhang 2010).

$$\nu_1 = \nu_0 \left( 1 - \frac{\vec{u}_o \cdot \vec{l}}{c} \right). \quad (1.2)$$

En la Ecuación 1.2  $\nu_1$  es la frecuencia percibida por el observador móvil,  $\nu_0$  es la frecuencia a la que emite la fuente,  $\vec{u}_o$  es la velocidad del observador,  $\vec{l}$  es un vector

unitario situado en la fuente con dirección hacia el observador, y  $c$  es la velocidad de la luz en el medio donde se encuentra la partícula.

La ALD utiliza un láser que ilumina a una partícula móvil suspendida en un flujo y un sensor con el que se determina la frecuencia de la luz emitida por esparcimiento por dicha partícula (Figura 1.1). En la interacción laser-partícula sucede el efecto Doppler descrito por la Ecuación 1.2. Después, en la interacción partícula-sensor, se da nuevamente el efecto Doppler pero esta vez descrito por la Ecuación 1.1. La aplicación sucesiva de las Ecuaciones 1.2 y 1.1 nos proporciona la frecuencia percibida por el sensor, que es diferente a la emitida por el láser y está relacionada con la velocidad de la partícula según la Ecuación 1.3 (Zhang 2010).

$$\nu_s \approx \nu_l \left( 1 - \frac{\vec{u}_p \cdot (\vec{l}_{sp} - \vec{l}_{pl})}{c} \right). \quad (1.3)$$

La Ecuación 1.3 representa el principio básico de la ALD y en ella  $\nu_s$  es la frecuencia percibida por el sensor,  $\nu_l$  es la frecuencia a la que emite el láser,  $\vec{u}_p$  es la velocidad de la partícula,  $\vec{l}_{pl}$  es un vector unitario en dirección de la diferencia entre la posición de la partícula y la posición del láser,  $\vec{l}_{sp}$  es un vector unitario en dirección de la diferencia entre la posición del sensor y la posición de la partícula, y  $c$  es la velocidad de la luz en el medio donde se encuentra la partícula. A la diferencia entre  $\nu_s$  y  $\nu_l$  se le conoce en inglés como *Doppler shift*.

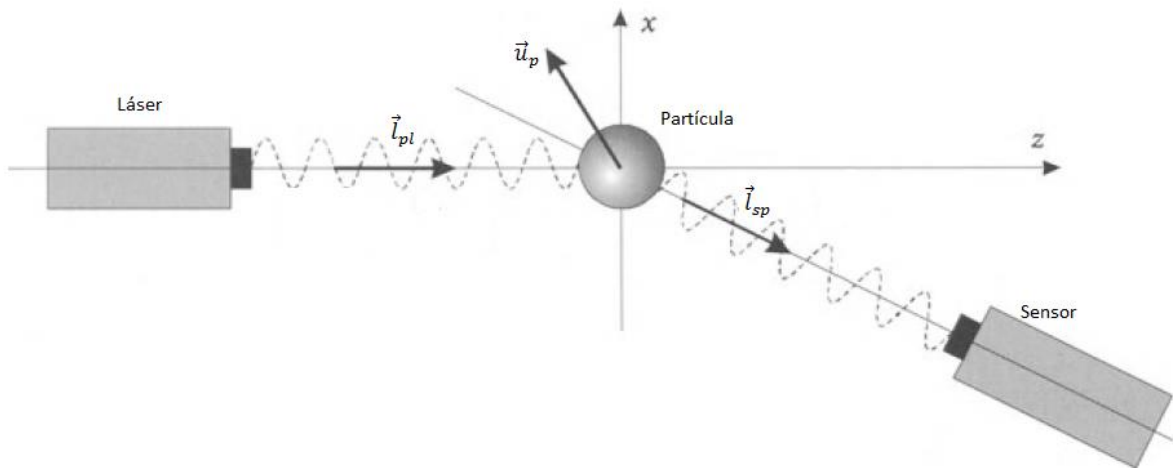


Figura 1.1 Principio básico de la ALD. Figura tomada y adaptada de Albrecht *et al.* (2003).

La frecuencia  $\nu_s$  es demasiado grande para ser medida con dispositivos convencionales por lo que las configuraciones prácticas en ALD consisten en la superposición o "mezcla" de dos ondas en la superficie del sensor (proceso que es conocido como heterodinación). Las ondas mezcladas pueden ser ambas provenientes del esparcimiento de la partícula (pero deben tener diferente *Doppler shift*) o una puede provenir del esparcimiento de la partícula mientras la otra proviene de un haz de referencia. Con la superposición de las dos ondas, en la superficie del sensor se puede observar una frecuencia llamada frecuencia Doppler. Varias configuraciones para obtener la frecuencia Doppler son descritas por Albrecht *et al.* (2003), sin embargo la más utilizada

es la conocida como configuración de doble haz (Figura 1.2). Con esta configuración las dos ondas mezcladas provienen de la partícula y cada una es debida al esparcimiento de la luz que proviene de dos haces con diferente dirección de propagación, lo que asegura que cada una de las ondas esparcidas tenga diferente *Doppler shift*. La frecuencia Doppler que podrá ser medida en el sensor con esta configuración está dada por la Ecuación 1.4 (Zhang 2010).

$$v_D = \frac{v_l}{c} |\vec{u}_p \cdot (\vec{l}_{pl2} - \vec{l}_{pl1})| = 2 \frac{u_{p\perp}}{\lambda_l} \sin \beta. \quad (1.4)$$

En la Ecuación 1.4  $v_D$  es la frecuencia Doppler que podría ser detectada en un sensor,  $v_l$  es la frecuencia de los haces incidentes en la partícula (en el caso de que ambos sean de la misma frecuencia),  $\vec{u}_p$  es la velocidad de la partícula,  $\vec{l}_{pl1}$  es un vector unitario en dirección de la diferencia entre la posición de la partícula y la posición del láser 1,  $\vec{l}_{pl2}$  es un vector unitario en dirección de la diferencia entre la posición de la partícula y la posición del láser 2,  $u_{p\perp}$  es la magnitud de la velocidad en dirección perpendicular al bisector del ángulo formado entre los haces,  $\beta$  es la mitad del ángulo formado entre los dos haces,  $c$  es la velocidad de la luz en el medio donde se encuentra la partícula y  $\lambda_l$  es la longitud de onda de los haces incidentes (en el caso de que ambos sean de la misma frecuencia).

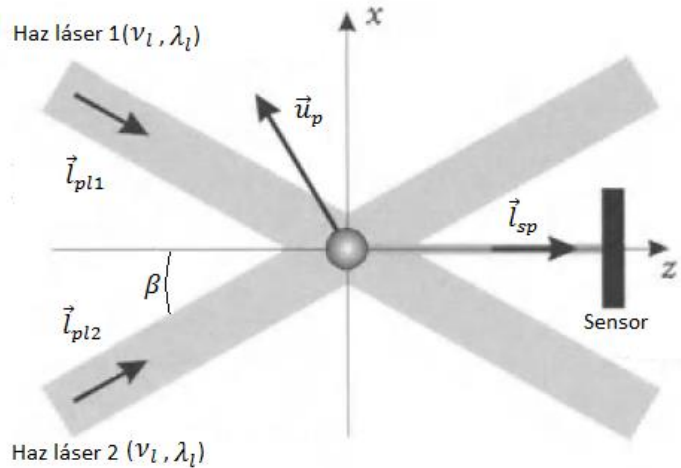


Figura 1.2 Configuración de doble haz. Figura tomada y adaptada de Albrecht *et al.* (2003).

Otra forma de determinar la frecuencia  $v_D$  es a través de los llamados patrones de interferencia. Se tiene que al superponer los dos haces se formará un patrón de intensidad con forma de franjas horizontales que, de forma ideal, estarán igualmente espaciadas (Figura 1.3), de tal manera que al pasar una partícula con cierta velocidad podrá emitir cierta intensidad de luz a una frecuencia determinada por la velocidad de la partícula perpendicular a las franjas y el espaciamiento entre ellas. En realidad el espaciamiento entre franjas varía a lo largo del volumen de medición debido a que para distancias cada vez más alejadas del punto de enfoque, el radio de curvatura del frente de onda disminuye. Dicha variación del espaciamiento entre franjas es mayor entre más



fuertemente estén enfocados los haces y puede llegar a ser despreciable al usar lentes con distancias focales grandes.

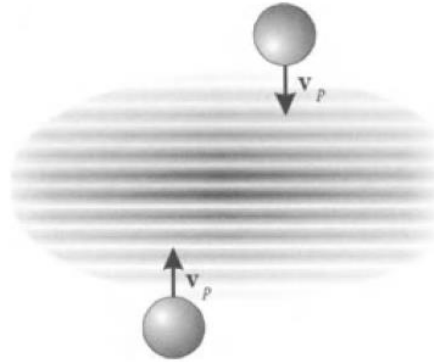


Figura 1.3 Patrón de interferencia. Figura tomada y adaptada de Albrecht *et al.* (2003).

Como se puede notar, con la configuración de doble haz en la que los dos haces tienen la misma frecuencia, una vez midiendo la frecuencia Doppler se podría determinar solamente el valor absoluto de la velocidad de la partícula a través de la Ecuación 1.4. Para poder determinar el sentido de la velocidad se permite que uno de los haces, digamos el haz 1, sea de una frecuencia mayor con respecto a la frecuencia del haz 2 (Figura 1.4). Con este cambio en la frecuencia del haz 1, la frecuencia que podría detectarse en el sensor es la dada por la Ecuación 1.5 (Zhang 2010).

$$\nu_s = \Delta\nu + 2\nu_l \frac{u_{p\perp}}{c} \sin \beta. \quad (1.5)$$

En la Ecuación 1.5  $\nu_s$  es la frecuencia que podría ser detectada en un sensor,  $\Delta\nu$  es el incremento en la frecuencia del haz 1 respecto al haz 2,  $\nu_l$  es la frecuencia del haz 2,  $u_{p\perp}$  es la magnitud de la velocidad en dirección perpendicular al bisector del ángulo formado entre los haces,  $\beta$  es la mitad del ángulo formado entre los dos haces y  $c$  es la velocidad de la luz en el medio donde se encuentra la partícula. Despejando la velocidad de la partícula en la Ecuación 1.5 se tendrá que, según la Figura 1.3, la partícula tendrá velocidad positiva en dirección  $x$  si la diferencia entre  $\nu_s$  y  $\Delta\nu$  es positiva. Si la diferencia es negativa la velocidad de la partícula será negativa. Mientras que si la diferencia es  $\Delta\nu$  la partícula no se estará moviendo en dirección  $x$ .

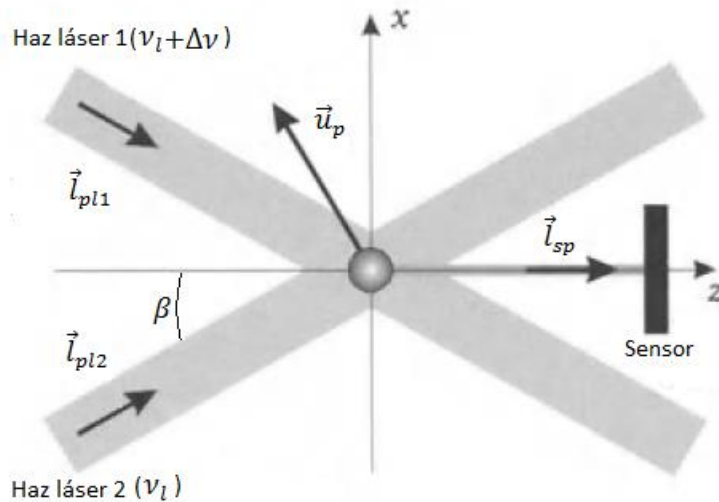


Figura 1.4 Configuración de doble haz, cada haz con frecuencia diferente. Figura tomada y adaptada de Albrecht (2003).

Es obvio que para que la velocidad de una partícula pueda ser determinada, ésta tiene que pasar a través de la zona donde se cruzan los haces, a esta zona se le conoce como volumen de medición y de su tamaño depende la resolución espacial que se puede alcanzar.

Hasta aquí se ha explicado el principio básico de la ALD. Sin embargo la aplicación de este principio de manera exitosa implica que las franjas producidas por interferencia tengan un espaciamiento uniforme sobre el volumen de medición, debido a que un espaciamiento no uniforme involucra un incremento del error en las mediciones de velocidad. Para lograr dicho espaciamiento uniforme en las franjas de interferencia cuando se aplica la ALD a microfluidos, un requisito es que los haces estén enfocados en un mismo punto con un margen de error muy acotado. Otro requisito que debe cubrir la ALD al usarse en escalas espaciales micrométricas es el de tener una resolución incluso submicrométrica. Para lograr una resolución espacial del orden requerido una opción es lograr que el volumen de medición tenga dimensiones de ese mismo orden. Para obtener tal volumen se debe hacer uso de lentes con distancia focal del orden de 10 mm como los usados por Tieu *et al.* (1995) o incluso de objetivos de microscopio. Sin embargo al hacer lo anterior se producirá un espaciamiento no uniforme entre las franjas de interferencia, lo que implica un incremento considerable en el error de las mediciones de velocidad obtenidas (Czarske y Büttner 2008). Otro efecto perjudicial producido por la disminución del volumen de medición es el decremento del número de franjas de interferencia que se pueden tener dentro del volumen de medición lo que disminuye la precisión del método (C. Meinhart *et al.* 2000).

A pesar de todo lo anterior, se han reportado trabajos en los que se realizan mediciones de velocidad con micro-ALD logrando resoluciones incluso submicrométricas por medio de un método que evita los errores producidos por el espaciamiento no uniforme de las franjas de interferencia (König *et al.* 2010). De hecho, dicho método aprovecha el espaciamiento variable de las franjas de interferencia producidas al cruzar

dos haces enfocados en el mismo punto para ubicar la posición de una partícula dentro del volumen de medición con resolución submicrométrica, además utiliza ALD para determinar la velocidad de dicha partícula (Czarske 2001). A pesar de que con el método reportado por König *et al.* (2010) la resolución puede dejar de ser un problema para ciertas aplicaciones, hay un requisito extra que debe ser cubierto por la micro-ALD en algunas aplicaciones de microfluidos: la capacidad de medir velocidades de entre uno y diez micrómetros por segundo (Ladavac y Grier 2004; Leach *et al.* 2006; Terray *et al.* 2002). Resulta que con los sensores desarrollados hasta ahora no es posible cubrir las necesidades de medición de velocidad de dichas aplicaciones (Büttner *et al.* 2006; König *et al.* 2010; Yoshida 2008).

## 1.2 Velocimetría por imágenes de partículas

La velocimetría por imágenes de partículas (VIP) es una técnica que permite obtener hasta tres componentes de velocidad sobre un plano (Bown *et al.* 2006), aunque en su configuración más sencilla es posible determinar con ella solo dos componentes. La idea básica de esta técnica es obtener imágenes consecutivas de un plano localizado dentro del flujo en el que se encuentran suspendidas partículas trazadoras que tienen una velocidad muy cercana a la del fluido. Las imágenes, que contienen información sobre la posición  $\vec{X}_f$  de cada partícula en el fluido, se obtienen con la iluminación del plano de interés que se logra con un láser y la óptica adecuada, y con el uso de una cámara. Si la cámara es capaz de tomar imágenes con un tiempo de exposición muy corto y lo hace cada cierto intervalo de tiempo  $\Delta t$  conocido, entonces, determinando el desplazamiento  $\Delta\vec{X}_i$  de las partículas entre una imagen y su subsecuente, se podrá determinar la velocidad  $\vec{u}_f$  de las partículas en el plano iluminado a través del cociente de dicho desplazamiento y el intervalo de tiempo (Ecuación 1.6) (Adrian 1991), el cual debe ser multiplicado por una constante  $1/M$  que transforma las coordenadas de la imagen en coordenadas del fluido, escalándolas. Con lo anterior se obtiene una aproximación de la velocidad del fluido en el plano iluminado que será tan buena como la capacidad de las partículas trazadoras para seguir fielmente el movimiento del fluido.

$$\vec{u}_f(\vec{X}_f, t) = \frac{1}{M} \frac{\Delta\vec{X}_i(\vec{X}_i, t)}{\Delta t}. \quad (1.6)$$

Para medir los desplazamientos de las partículas con la técnica de VIP primero se divide cada una de las imágenes en pequeñas regiones rectangulares conocidas como ventanas de interrogación. El tamaño de la ventana de interrogación debe ser tal que la suposición de que no existen gradientes de velocidad al interior de la ventana no involucre un error considerable. Entonces lo que se busca es, para cada ventana de interrogación de una imagen 1 tomada en el tiempo  $t$ , la posición que tiene dicha ventana en la imagen 2 tomada en el tiempo  $t + \Delta t$ . La diferencia entre la posición de una ventana en la imagen 2 y la posición de la misma ventana en la imagen 1 proporciona el vector de desplazamiento  $\Delta\vec{X}$  de ésta, que a su vez representa el desplazamiento promedio de las partículas dentro de la ventana.

Actualmente es convencional que las imágenes obtenidas sean digitales. Una imagen digital está compuesta por un número finito de píxeles ordenados en matrices (renglones y columnas), en donde el valor de cada píxel representa la intensidad de luz en una escala de grises. Se puede ubicar a cada píxel con el número de renglón ( $m$ ) y de columna ( $n$ ) en el que se encuentra. El desplazamiento  $\Delta\vec{X}(m,n)$  de una ventana de interrogación  $I$  con su centro situado en  $X(m,n)$  en una imagen 1 podría obtenerse al encontrar una posición  $X'(x,y)$  dentro de una muestra  $I'$  con su centro ubicado en  $X(m,n)$  en una imagen 2, de tal manera que en dicha posición se pudiera tener, estadísticamente hablando, la mejor correspondencia entre  $I$  e  $I'$ , donde los lados de la muestra  $I'$  son el doble de los lados de  $I$  (Figura 1.5). De acuerdo a lo anterior,  $X'(x,y)$  representaría el desplazamiento  $\Delta\vec{X}(m,n)$  de la ventana de interrogación  $I$ .

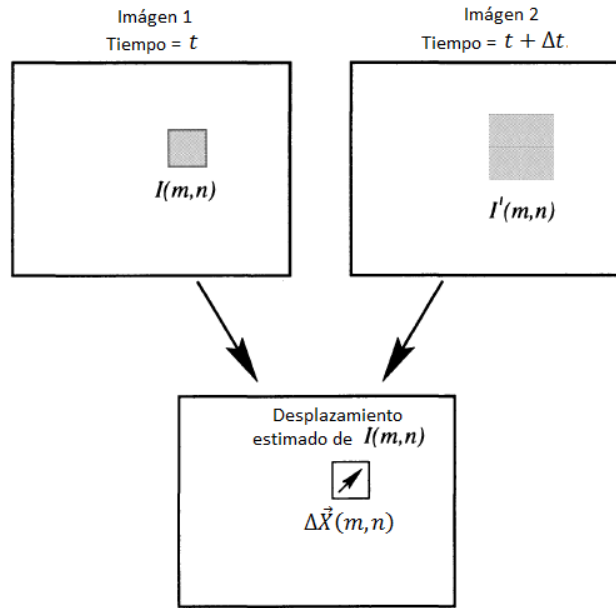


Figura 1.5 Esquema de la estimación del desplazamiento de una ventana de interrogación. Figura tomada y adaptada de Raffel *et al.* (2007).

El grado de correspondencia entre  $I$  e  $I'$ , para una posición cualquiera  $X'(x,y)$  de  $I$  dentro de  $I'$  puede ser calculado a través de la función de correlación cruzada en su forma discreta dada por la Ecuación 1.7 (Raffel *et al.* 2013), en el caso de que las imágenes 1 y 2 sean digitales.

$$R(x,y) = \sum_{i=-K}^K \sum_{j=-L}^L I(i,j)I'(i+x,j+y). \quad (1.7)$$

En la Ecuación 1.7,  $I(i,j)$  representa el valor en escala de grises del píxel ubicado en  $(i,j)$  dentro de la ventana de interrogación  $I$  e  $I'(i+x,j+y)$  representa el valor en escala de grises del píxel ubicado en  $(i+x,j+y)$  dentro de la muestra  $I'$ . La Ecuación 1.7 involucra el recorrido de la ventana de interrogación  $I$  sobre la muestra  $I'$ , píxel por píxel y en ambas direcciones, con el valor de la función de correlación  $R(x,y)$  dado para cada posición de  $I$  sobre  $I'$  por la suma de las multiplicaciones de los píxeles traslapados. Siendo los lados de  $I'$  del doble de los lados de  $I$ , en donde el tamaño de  $I$  es  $M \times N$ , se

producirá un plano de correlación con tamaño  $M + 1 \times N + 1$  (Figura 1.6). La posición del valor de correlación máximo en el plano de correlación (a este valor se le conoce como señal de correlación) proporciona el valor del desplazamiento  $\Delta\vec{X}(m, n)$  de la ventana de interrogación  $I$ . La Figura 1.7 muestra los resultados de la aplicación de la función de correlación dada por la Ecuación 1.7 a una ventana de interrogación  $I$  sobre una muestra  $I'$ .

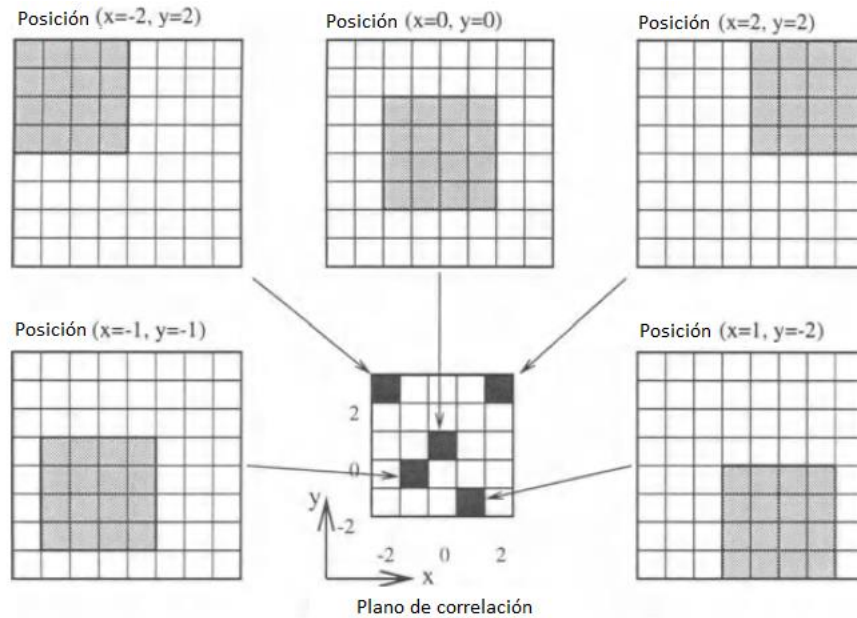


Figura 1.6 Esquema de formación del plano de correlación. Figura tomada y adaptada de Raffel *et al.* (2013).

A pesar de que el cálculo de la función de correlación es efectivo al realizarse según lo explicado en el párrafo anterior, puede llegar a ser computacionalmente costoso por el número de operaciones que involucra. Para hacer más eficiente dicho cálculo se hace uso del teorema de correlación, que establece que la correlación de dos funciones es equivalente a la multiplicación del complejo conjugado de las transformadas de Fourier de dichas funciones (Ecuación 1.8).

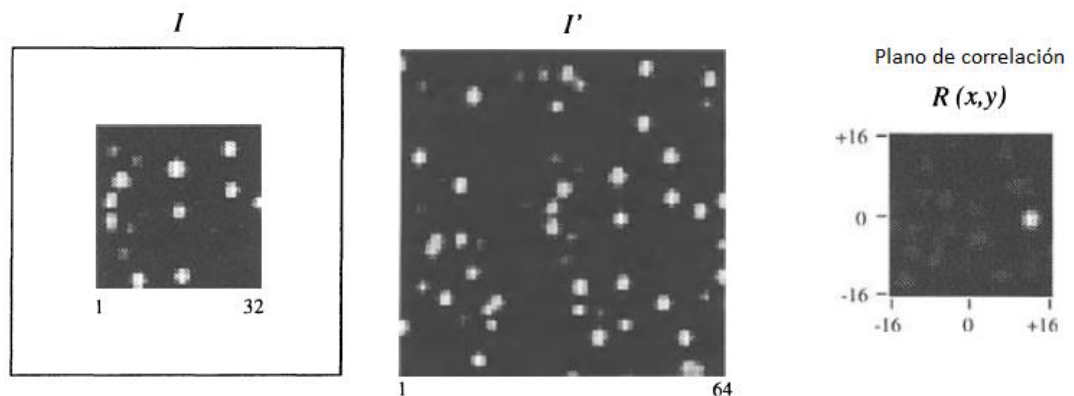


Figura 1.7 Cálculo de la función de correlación cruzada para un ejemplo real en el que  $I$  es de  $32 \times 32$  píxeles mientras que  $I'$  es de  $64 \times 64$  píxeles. Por la ubicación del máximo en el plano de correlación se aprecia que el desplazamiento de  $I$  es hacia la derecha. Figura tomada y adaptada de Raffel *et al.* (2013).

$$R \leftrightarrow \hat{I} \cdot \hat{I}'. \quad (1.8)$$

En la Ecuación 1.8  $\hat{I}$  e  $\hat{I}'$  son las transformadas de Fourier de las funciones  $I$  e  $I'$ . En la práctica,  $\hat{I}$  e  $\hat{I}'$  son calculadas para funciones discretas por medio de la transformada rápida de Fourier (TRF).

Hasta ahora se ha descrito la técnica básica para realizar VIP, sin embargo, en la práctica es necesario considerar ciertos aspectos de los que depende el adecuado desempeño de la técnica. Por ejemplo, al calcular la función de correlación por medio de la TRF se asume que las funciones  $I$  e  $I'$  son periódicas, lo que puede producir que los valores calculados para la función de correlación en las orillas del plano de correlación sean subestimados. Para evitar lo anterior el rango del desplazamiento permitido para una ventana de interrogación debe ser reducido, disminuyendo el intervalo de tiempo entre la captura de una imagen y otra (Raffel *et al.* 2013). Otra forma de evitar la subestimación mencionada es ponderando de forma diferente el resultado obtenido de la función de correlación dependiendo de su ubicación dentro del plano de correlación (Raffel *et al.* 2013).

Otro aspecto que se debe procurar es el mejoramiento de la señal de correlación. Diversas formas para lograr dicho mejoramiento son mencionadas por Raffel *et al.* (2013), entre las que está el preprocesamiento de las imágenes (básicamente por medio de filtros), el promediado de varios planos de correlación correspondientes a ventanas de interrogación contiguas y el promediado de varios planos de correlación correspondientes a una misma ventana pero para diferentes pares de imágenes.

Otra forma de mejorar el desempeño de la VIP es mediante el uso de algoritmos más sofisticados para determinar el desplazamiento de una ventana de interrogación. La mayoría de estos algoritmos se enfoca en el mejoramiento de la resolución de la técnica (Cowen and Monismith 1997; Stitou and Riethmuller 2001) o en lidiar con las limitaciones producidas por la consideración principal del algoritmo básico de que las partículas dentro de una ventana de interrogación tienen gradientes de velocidad despreciables (Jambunathan *et al.* 1995)

Además de las precauciones hasta ahora mencionadas, otras consideraciones deben tenerse en cuenta al usar VIP en microfluidos. En primer lugar, la resolución depende del tamaño de ventana de interrogación elegido, pero al disminuir el tamaño de la ventana deberá disminuir también el tamaño de las partículas, esto con el fin de que exista dentro de cada ventana una cantidad de partículas adecuada para que la función de correlación proporcione desplazamientos válidos. Keane y Adrian (1992) encontraron, por ejemplo, que usando correlación cruzada de dos imágenes expuestas una sola vez entre las que no existe ninguna pérdida de partículas, las ventanas de interrogación deberán de tener al menos 5 partículas para asegurar una probabilidad del 95% de calcular un desplazamiento válido. Por lo anterior y porque la incertidumbre disminuye al incrementar el número de partículas por ventana, en micro-VIP típicamente se emplean partículas de varios cientos de nanómetros de diámetro como máximo (Raffel *et al.* 2013). Además, debido a que con estos tamaños de partícula la luz esparcida disminuye mucho en comparación con la luz

esparcida por las partículas usadas en VIP convencional, típicamente las partículas usadas deben emitir una luz adicional por medio del fenómeno de fluorescencia.

El sistema de iluminación debe cambiar también en micro-VIP. Puesto que en escala micrométrica difícilmente se puede formar un plano de iluminación por la falta de acceso óptico, la iluminación de las partículas debe realizarse en forma volumétrica mediante un haz perpendicular al plano donde se pretende medir la velocidad. El haz puede estar enfocado con un objetivo de microscopio de tal manera que solo las partículas que se encuentren en un rango de profundidades estén bien iluminadas, mientras que las que estén fuera de ese rango tengan una iluminación pobre de tal forma que contribuyan a la imagen sólo como ruido.

Otro aspecto que debe considerarse al trabajar con micro-VIP es que los desplazamientos de las partículas debido al movimiento Browniano dejan de ser despreciables. Para intervalos de tiempo  $\Delta t$  mucho mayores al tiempo de respuesta inercial de una partícula, su desplazamiento debido al movimiento Browniano es independiente de la densidad de la partícula o del fluido, y el error en el desplazamiento calculado para dicha partícula está dado por la Ecuación 1.9 (Wereley *et al.* 2002).

$$\varepsilon = \frac{1}{u} \sqrt{\frac{2D}{n\Delta t}}. \quad (1.9)$$

En la Ecuación 1.9,  $\varepsilon$  es el error en el desplazamiento calculado,  $u$  es la magnitud de velocidad,  $\Delta t$  es el intervalo de tiempo entre la captura de una imagen y otra,  $n$  es el número de mediciones utilizado para determinar el desplazamiento, y  $D$  es el coeficiente de difusión de Einstein para el caso de una partícula esférica sujeta a la ley Stokes (Ecuación 1.10).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta\alpha}. \quad (1.10)$$

En la Ecuación 1.10  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta del fluido,  $\alpha$  es el diámetro de la partícula y  $\eta$  es la viscosidad dinámica del fluido. En ella se puede observar que el error aumenta cuando disminuye la velocidad o el intervalo de tiempo. Por ejemplo, para una velocidad de  $1 \mu\text{m/s}$ , un diámetro de partícula de  $1 \mu\text{m}$ , un intervalo de tiempo de 100 ms y temperatura ambiente, se tendrá un error del 317% debido al movimiento Browniano. Mientras que para una partícula de  $0.5 \mu\text{m}$  de diámetro bajo las mismas condiciones el error en la medición de velocidad asociado al movimiento Browniano sería de 448%.

Para evitar la influencia del movimiento Browniano en las mediciones obtenidas por micro-VIP, además de trabajar con un intervalo de tiempo que minimice dichos efectos, es necesario implementar métodos especiales de procesamiento. Por ejemplo, Meinhart *et al.* (2000b) reportan un método en el que no se obtiene el desplazamiento de una ventana de interrogación directamente de la correlación de un par de imágenes, sino que se promedian los planos de correlación coincidentes en una secuencia de más de varias imágenes. También se han empleado métodos especiales de procesamiento en micro-VIP

con la finalidad de mejorar la señal de correlación cuando las imágenes a correlacionar tienen una baja densidad de partículas (Wereley *et al.* 2002). A pesar de los esfuerzos mencionados, debido a la necesidad de que las ventanas de interrogación contengan varias partículas las resoluciones espaciales alcanzables con micro-VIP difícilmente llegan a ser de un par de micrómetros (Raffel *et al.* 2013).

### **1.3 Velocimetría por seguimiento de partículas**

La velocimetría por seguimiento de partículas (VSP) es una técnica que permite obtener hasta tres componentes de velocidad sobre un plano (Bown *et al.* 2006), aunque en su configuración más simple es posible determinar con ella solo dos componentes. Al igual que la VIP, la VSP se basa en la captura de imágenes a intervalos de tiempo fijos, sin embargo, lo que se pretende es determinar el desplazamiento entre imágenes de partículas individuales en lugar del desplazamiento de un grupo de partículas contenidas en una ventana de interrogación (Hassan y Canaan 1991). Por lo anterior, la forma de obtener las imágenes en VSP es la misma que en VIP (incluso a escalas micrométricas), sin embargo la forma de procesarlas cambia. Los resultados obtenibles con la versión más simple de VSP también son diferentes en cuanto a que se obtienen vectores de velocidad en puntos aleatorios por los que van pasando las partículas suspendidas en un instante determinado, en lugar de obtener dichas mediciones de un campo completo como en VIP. Para conseguir un campo de velocidades completo usando VSP debe recurrirse a la interpolación (Hassan y Canaan 1991), lo que implica un error de la técnica en mayor o menor medida dependiendo de la densidad de partículas.

El procesamiento de las imágenes en VSP para determinar la velocidad de las partículas se puede dividir en tres fases: detección de las partículas, localización de centroides de las partículas, y vinculación de las partículas entre dos imágenes consecutivas.

Para la detección de partículas existen varios métodos reportados. El más simple de todos consiste en fijar un umbral de intensidad en escala de grises por encima del cual se considera que un pixel forma parte de una partícula (Cowen y Monismith 1997; Hassan y Canaan 1991). Sin embargo, este método solo es aplicable si las imágenes contienen un número pequeño de partículas de gran tamaño muy bien iluminadas (Ohmi y Li 2000). La capacidad de un algoritmo para detectar partículas individuales, aun en una imagen en la que hay partículas traslapadas y tanto la iluminación como el tamaño de partícula son variables, para muchas aplicaciones determina en gran medida la capacidad de la VSP para vincular sin ambigüedades a dos partículas entre dos imágenes consecutivas (Maas *et al.* 1993; Ohmi y Li 2000). La sofisticación de los métodos para detección de partículas se debe, en muchas aplicaciones, a la necesidad de trabajar con una alta densidad de partículas en las imágenes para disminuir el error debido a la interpolación y así aumentar la resolución (Malik *et al.* 1993; Ohmi y Li 2000), lo que a su vez aumenta el número de partículas traslapadas y las variaciones en iluminación y tamaño de partículas. Por ejemplo, Takehara y Etoh (1998) reportan un método basado en operaciones de correlación de una “máscara” gaussiana con la imagen. Otro método interesante es



planteado por Ohmi y Li (2000), en él se utiliza un umbral de intensidad que varía dependiendo de la intensidad de cada partícula en la imagen.

El método usado para localizar el centroide de una partícula juega un importante rol para que la precisión obtenida con VSP pueda ser menor a un pixel. La forma más obvia de calcular el centroide de una partícula es usando la definición de esta propiedad una vez que la partícula ha sido detectada (Hassan y Canaan 1991). Existen también métodos para calcular el centroide de una partícula que consisten en ajustar los valores de intensidad del pixel con mayor valor en escala de grises y dos de sus pixeles contiguos a una función exponencial, gaussiana, o a la definición de centroide para tres puntos. Cowen y Monismith (1997) analizan el desempeño que tienen estos últimos tres métodos en sus experimentos y observan que el método que ajusta los valores de intensidad a una función gaussiana se desempeña mejor.

El algoritmo de vinculación entre partículas de imágenes consecutivas representa la esencia de la técnica VSP, pues la correcta correspondencia entre ellas, sin ninguna ambigüedad, determinará la correcta estimación de su desplazamiento. Una primera opción es vincular cada partícula de una imagen con la partícula más cercana en la imagen subsecuente. Sin embargo, este algoritmo está limitado a imágenes en las que los desplazamientos de las partículas son mucho menores que el espaciamiento que hay entre ellas (Malik *et al.* 1993). Para las aplicaciones en las que se debe usar una alta densidad de partículas o en las que existen fuertes gradientes de velocidad se han desarrollado métodos más sofisticados. Por ejemplo, el método reportado por Hassan y Canaan (1991) permite disminuir la ambigüedad en imágenes con densidad de partículas mediana y con gradientes de velocidad no muy fuertes al utilizar información proporcionada por cuatro imágenes consecutivas para realizar la vinculación entre las partículas de dos de estas imágenes. Métodos como el de Okamoto *et al.* (1995) están enfocados sobre todo a disminuir la ambigüedad causada por los gradientes de velocidad. Cowen y Monismith (1997) presentan un método en el que se aplica tanto VIP como VSP a imágenes con una muy alta densidad de partículas. Con él pueden tomarse en cuenta los gradientes de velocidad al interior de una ventana de interrogación al realizar primero mediante VIP una estimación del desplazamiento promedio de cada ventana de interrogación, para después hacer el seguimiento de las partículas de cada ventana usando la estimación obtenida.

Existen pocos trabajos del uso de VSP en microfluidos a escalas de velocidad pequeñas. Los artículos en los que se aborda esta aplicación que se han encontrado son: Bown *et al.* (2006) y Sato *et al.* (2003). Las precauciones al usar VSP en microfluidos son similares y, a excepción de las precauciones referentes a influencia del movimiento Browniano, pueden resolverse de la misma manera. Sato *et al.* (2003) proponen un método para eliminar la influencia del movimiento Browniano. Primero se calcula el desplazamiento de cada partícula entre dos imágenes usando algún método de vinculación de partículas y después se promedia el desplazamiento de un grupo de partículas. Si las partículas entre las que se hace el promedio están lo suficientemente cercanas como para que no haya gradientes en la velocidad del fluido, las diferencias entre los desplazamientos medidos para cada una de dichas partículas serán causadas

únicamente por el movimiento Browniano. Ahora, como el movimiento Browniano es un fenómeno completamente aleatorio tanto en espacio como en tiempo, si el promedio se realiza para una cantidad adecuada de partículas, el movimiento Browniano dejará de influir en las mediciones de velocidad. De acuerdo a lo anterior, al emplear el método de Sato *et al.* (2003) deben usarse partículas tan pequeñas como las usadas en micro-VIP, además de altas concentraciones de partículas, por lo que algoritmos similares al empleado por Cowen y Monismith (1997) deben emplearse para realizar la vinculación de las partículas. A pesar de que el método de Sato *et al.* (2003) es efectivo para eliminar la influencia del movimiento Browniano las resoluciones espaciales obtenibles con él son de varios micrómetros, lo que lo limita en aplicaciones en las que se requiere de resolución submicrométrica.

#### **1.4 Método de comparación-validación propuesto**

Parte importante de este trabajo es la comparación de las mediciones de velocidad hechas con PO con las obtenidas mediante algún otro método experimental como una forma de validar a la PO como una herramienta de medición de velocidad en microfluidos. Por lo anterior, un punto importante es la selección de una técnica de comparación-validación adecuada basada en las técnicas experimentales cuyo uso en microfluidos ya ha sido reportado. Las características principales que el método de comparación-validación debe tener son claras: debe tener capacidad para medir velocidades tan cercanas a  $1 \mu\text{m/s}$  como sea posible (debido a la relevancia que ello tiene en dispositivos *lab-on-a-chip* y porque es en este orden de magnitud en donde se acentúan las limitaciones de las técnicas adaptadas de la macroescala al mismo tiempo que se resaltan las ventajas del uso de PO's), debe evitar dentro de lo posible la influencia del movimiento Browniano y debe poderse realizar con el material y equipo disponibles.

La micro-ALD como técnica para comparar los resultados obtenidos con PO's no puede ser una opción factible, aun cuando la resolución espacial alcanzable con algunos métodos sea adecuada, puesto que las velocidades medibles con esta técnica son altas en comparación con las que se quieren observar. Además, para utilizar la ALD como método de validación sería necesario diseñar un método que evite en lo posible la influencia del movimiento Browniano puesto que ello no se ha visto reportado en la literatura.

Por otro lado aunque la VIP es una técnica que puede ser implementada con éxito en la microescala, para lograrlo deben ser usadas partículas bastante más pequeñas que las usadas en la escala macrométrica (muchas veces partículas fluorescentes) y se deben emplear algoritmos de procesamiento especiales para evitar la influencia del movimiento Browniano en las mediciones. Además, la necesidad de utilizar una alta concentración de partículas hace que la micro-VIP deje de ser conveniente para algunas aplicaciones debido a la posible alteración del flujo o del funcionamiento del dispositivo. Por todo lo anterior, para el caso particular de este trabajo, se descartó a la micro-VIP como método de comparación-validación de los resultados que se puedan obtener con el sistema basado en PO, dado que no se cuenta con las partículas ni con el sistema de iluminación adecuado.

Una opción más atractiva es la micro-VSP puesto que, aunque se ha creado una variedad de algoritmos sofisticados de detección y vinculación de partículas, el uso de estos algoritmos es indispensable solamente en flujos turbulentos en los que se requiere evitar ambigüedad aun con gran densidad de partículas y altos gradientes de velocidad, mientras que los algoritmos más sencillos son una buena opción para flujos laminares con poca densidad de partículas en los que difícilmente existe ambigüedad en la correspondencia de partículas entre dos imágenes consecutivas. Por otro lado, aunque el tratamiento de la influencia del movimiento Browniano mediante el método propuesto por Sato *et al.* (2003) involucra el uso de partículas con las que no se cuenta, lo que se propone hacer es sustituir el promedio espacial realizado por ellos por un promedio temporal hecho para un flujo totalmente desarrollado al interior de dos placas semi-infinitas y en estado estacionario. La idea es suspender partículas de diámetro del orden de una micra en un fluido que pasará por un microcanal con características similares a las de dos placas planas semi-infinitas con la ayuda de una bomba que entregue un caudal constante, grabar video del flujo en una pequeña región central del canal y mediante la técnica de VSP determinar la velocidad de las partículas que pasan por la región de grabación a través de un tiempo suficientemente largo como para tener un conjunto de mediciones estadísticamente grande. Puesto que el movimiento Browniano es un fenómeno aleatorio también en el tiempo y gracias a las condiciones de medición planteadas, un promedio temporal de la velocidad determinada por VSP en la región central del canal debe tender a evitar la influencia del movimiento Browniano en la medición conforme el número de datos usados en el promedio se incrementa.

Con lo anterior ha quedado propuesto el método de comparación-validación de las mediciones hechas con PO que se presentarán en los resultados de este trabajo. En el siguiente [capítulo](#) se abordarán las PO's como una herramienta de velocimetría atractiva, alternativa e incluso sustituta de las técnicas presentadas en este Capítulo para el uso en ambientes micrométricos.

## Capítulo 2: Pinzas ópticas como herramienta para medir velocidad en microfluidos

Ante la necesidad de medir velocidad en condiciones bajo las que el movimiento Browniano tiene una gran influencia y hacerlo con resolución incluso submicrométrica, las pinzas ópticas (PO's) emergen como una alternativa atractiva. La finalidad de este Capítulo es exponer brevemente la teoría que explica el atrapamiento de una partícula con una PO y la forma como puede ser modelado su comportamiento, para concentrarse después en la manera de medir velocidad con una PO, en la discusión de los trabajos previos en los que se han usado las PO's para medir velocidad en microfluidos, así como en la teoría detrás de la obtención experimental de los parámetros que hacen posible la medición de velocidad.

### 2.1 Fuerzas de atrapamiento

Se le llama PO al potencial producido por un haz láser altamente enfocado que es capaz de mantener atrapada a una partícula dieléctrica con índice de refracción mayor que el del medio en el que se encuentra. Este atrapamiento se origina por las fuerzas inducidas sobre dicha partícula cuando se produce un cambio de momentum en los fotones del haz que inciden sobre ella al estar situada cerca del punto de enfoque. El tamaño aproximado de las partículas que se pueden atrapar en una PO va de los 25 nanómetros a los 10 micrómetros (Ashkin *et al.* 1986) y las fuerzas que se generan sobre una partícula atrapada son típicamente del orden de piconewtons. Lo anterior se puede verificar teórica o experimentalmente.

Para explicar y calcular teóricamente las fuerzas ejercidas sobre una partícula atrapada se pueden tomar tres diferentes enfoques dependiendo del tamaño de dicha partícula respecto a la longitud de onda del láser con que se produce la pinza (llamado láser de atrapamiento) (Ashkin 1992; Harada y Asakura 1996; Nieminen *et al.* 2010). Dos de los enfoques se aplican a casos particulares, uno a través de la óptica geométrica y el otro por medio de la aproximación de Rayleigh. El enfoque más general, aunque más complejo, utiliza la teoría generalizada de Lorenz-Mie.

La óptica geométrica puede brindar una explicación cualitativa y fácil de entender del fenómeno de atrapamiento: desde el punto de vista electromagnético, la luz es una onda que se propaga transportando, en la dirección en que viaja, energía con su correspondiente momentum asociado. En la óptica geométrica, un rayo representa una onda electromagnética plana que transporta cierta cantidad de energía por segundo y por unidad de área denominada irradiancia o, más comúnmente, intensidad y, al mismo tiempo, una cantidad de momentum por unidad de tiempo y por unidad de área denominada presión de radiación, que es proporcional a la intensidad del rayo (Hecht 2002). Debido al transporte de momentum asociado al rayo luminoso, puede considerarse que en cualquier cambio de dirección que el rayo sufra está involucrada la acción de una fuerza sobre él. Analicemos el comportamiento de dos rayos típicos que forman parte de un haz láser altamente enfocado y que inciden sobre una partícula con índice de

refracción mayor al del medio como en el caso de una PO (Figura 2.1). Cada rayo se refractará dos veces, al “entrar” y “salir” de la partícula, produciéndose en cada uno de ellos un cambio neto de dirección. Considerando que no existe reflexión en las interfaces partícula-medio ni absorción en la partícula, el cambio neto de dirección de cada rayo involucrará un cambio neto en su momentum, lo que implica la acción de una fuerza ejercida por la partícula sobre el rayo o, lo que es lo mismo, una fuerza ejercida por el rayo sobre la partícula. En caso de que el centro de la partícula se encuentre sobre el eje de propagación del haz pero ligeramente adelante del punto focal (Figura 2.1a), la fuerza neta producida sobre la partícula por la refracción de los rayos tratará de moverla hacia el punto de enfoque del haz, que es la posición de la partícula donde la fuerza neta producida por la refracción de los rayos es cero. Algo similar sucederá si la partícula se encuentra sobre el eje de propagación del haz pero ligeramente atrás del punto de enfoque (Figura 2.1b) o si se encuentra en el plano focal pero ligeramente movida del punto de enfoque en dirección transversal (Figura 2.1c): se producirá una fuerza neta que tratará de mover a la partícula hacia el punto focal, que es donde hay una mayor intensidad (Ashkin 1992).

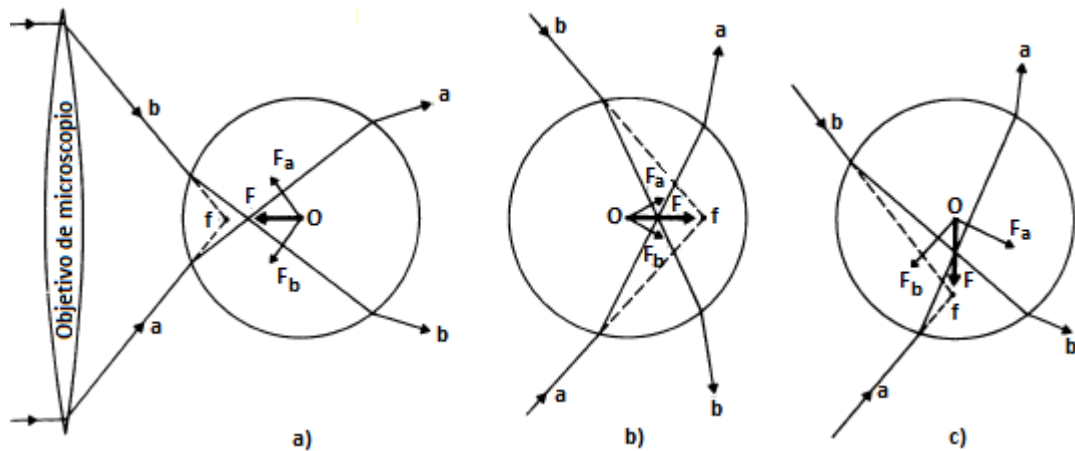


Figura 2.1 Comportamiento de dos rayos típicos que forman parte de un haz láser altamente enfocado y que inciden sobre una partícula con índice de refracción mayor al del medio. Figura tomada y adaptada de Ashkin (1992).

Las fuerzas que tratan de llevar a la partícula hacia la zona de mayor intensidad forman un potencial y se conocen como fuerzas de gradiente, ya que, como se ilustra en la Figura 2.2, cuando una partícula se encuentra dentro de un gradiente de intensidad, por ejemplo al hacer incidir sobre ella un haz láser colimado y con perfil de intensidad gaussiano, la refracción de los rayos incidentes produce una fuerza sobre la partícula en dirección de dicho gradiente. Bajo la situación anterior se produce además una fuerza en la dirección de propagación del haz (dirección axial) que es causada por las mismas refracciones que producen la fuerza de gradiente, como se bosqueja en la Figura 2.2.

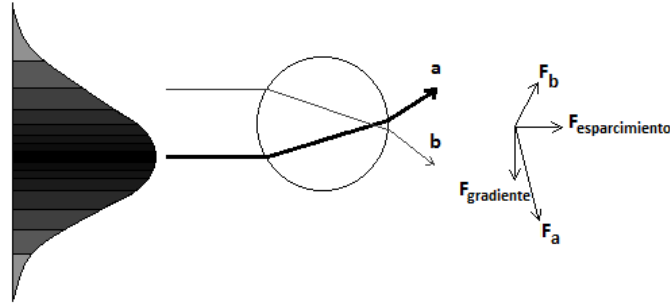


Figura 2.2 Fuerzas producidas sobre una partícula que se encuentra en medio de un gradiente de intensidad. Figura tomada y adaptada de Woerdemann (2012).

En el caso de dos rayos típicos de una PO también se produce una fuerza que actúa en la dirección y el sentido de propagación del haz, sin embargo, dicha fuerza se debe principalmente a los cambios de momentum producidos por las reflexiones que se producen en la interfaz medio-partícula, inicialmente propuestas como despreciables, así como por las refracciones subsecuentes de dichos rayos reflejados. Es por lo anterior que a las fuerzas que actúan en la dirección axial se les conoce como fuerzas de esparcimiento. Para lograr un atrapamiento estable en 3-D es necesario que la fuerza neta de gradiente ejercida en dirección axial por cada uno de los rayos que componen el haz sea más grande que la fuerza neta de esparcimiento. Para garantizar lo anterior es necesario lograr fuertes gradientes de intensidad por medio del uso de objetivos de microscopio de gran apertura numérica (Neuman y Block 2004).

Además de que la óptica geométrica es una excelente herramienta para entender cualitativamente el fenómeno de atrapamiento, con ella se puede obtener un cálculo de las fuerzas ejercidas sobre la partícula atrapada con un buen nivel de aproximación siempre que se garantice las condiciones necesarias para su uso (Nieminen *et al.* 2010): la partícula atrapada debe ser mucho más grande que la longitud de onda del láser de atrapamiento (típicamente el diámetro de la partícula debe ser diez veces más grande que la longitud de onda del haz de atrapamiento). De un análisis cuantitativo basado en óptica geométrica se puede observar que, al usar un haz lo suficientemente enfocado, existe una región dentro de la que la fuerza total que actúa sobre la partícula atrapada en dirección axial, o en cada una de las direcciones transversales, es proporcional a la distancia que hay entre el centro de la partícula y el punto de equilibrio en esa misma dirección, o en las direcciones transversales (Ashkin 1992) (Figura 2.3).

Un análisis del fenómeno de atrapamiento utilizando adecuadamente la aproximación de Rayleigh brindaría cualitativamente los mismos resultados que el fenómeno analizado desde la perspectiva de la óptica geométrica (Harada y Asakura 1996, [Apéndice A](#)). Es decir, se tendría que las fuerzas que actúan sobre una partícula atrapada en una PO pueden ser clasificadas en dos tipos: las fuerzas de gradiente que producen un atrapamiento estable y las fuerzas debidas al esparcimiento que tratan de empujar a la partícula en la dirección de propagación del haz de atrapamiento, pudiendo existir, a pesar de lo anterior, una zona en cada una de las direcciones dentro de la que la fuerza neta ejercida sobre la partícula es proporcional a la distancia entre la partícula y el punto donde la fuerza neta es cero. Si se usara la teoría generalizada de Lorenz-Mie para analizar

el atrapamiento de una partícula cuyo tamaño no permitiera el uso de la óptica geométrica o de la aproximación de Rayleigh se tendrían igualmente los mismos resultados cualitativos (Nieminen 2010). De esta manera, una pinza óptica estable en 3-D puede ser caracterizada, dentro de un régimen de desplazamientos pequeños de la partícula atrapada, como un resorte con constante de rigidez  $k_i$  con  $i = x, y, z$ , siendo  $x$ ,  $y$  y  $z$  direcciones mutuamente perpendiculares, una de ellas alineada con la dirección de propagación del haz de atrapamiento.

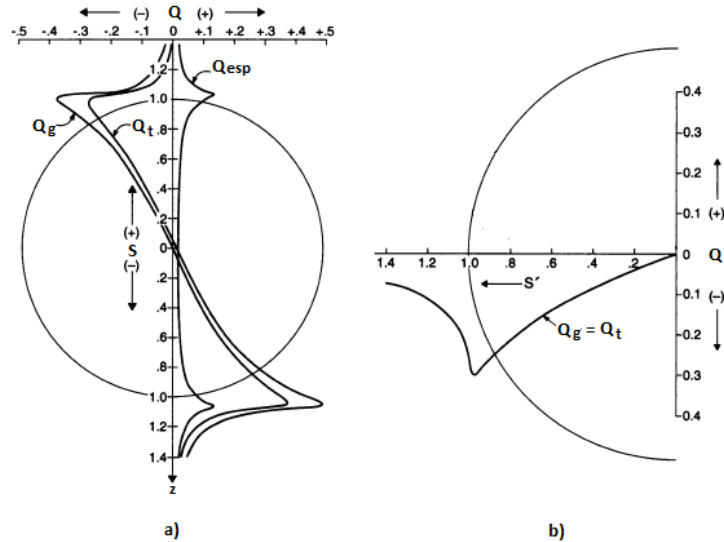


Figura 2.3 a) Fuerza de gradiente, de esparcimiento y total ( $Q_g$ ,  $Q_{esp}$  y  $Q_t$ ) ejercidas por una PO en la dirección axial al estar enfocado a una distancia  $S$  del centro de la partícula en esa misma dirección, b) Fuerza de gradiente o total ( $Q_g$  o  $Q_t$ ) ejercida por una PO en una de las direcciones transversales al estar enfocado a una distancia  $S'$  del centro de la partícula en esa misma dirección. La fuerza en dirección transversal es simétrica. El valor de las fuerzas, tanto en dirección axial como transversal, está normalizado con respecto a la fuerza que ejercería el haz de atrapamiento si incidiera sobre una pared perfectamente reflejante en lugar de incidir sobre la partícula. Figura tomada y adaptada de Ashkin (1992).

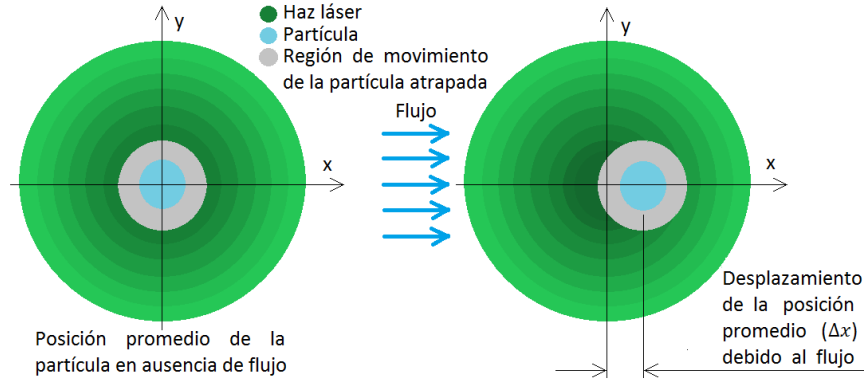
## 2.2 Pinzas ópticas y microvelocimetría

### 2.2.1 Medición conceptual de velocidad con pinzas ópticas

Si bien una partícula atrapada en una PO no permanece inmóvil, sino que presenta movimiento Browniano, este movimiento se encuentra confinado dentro de cierta región tridimensional cercana al centro del potencial creado por la pinza y la distribución de posiciones que sigue dicha partícula es gaussiana (Rohrbach y Stelzer 2007). Bajo tal distribución, la mayor densidad de probabilidad se tendrá en el centro del potencial creado por la pinza (sobre el eje de propagación un poco hacia adelante del punto de enfoque del haz) y se puede considerar que el promedio de la posición de la partícula coincide con el centro del potencial. Esto último es válido siempre que para obtener dicho promedio se considere un número suficientemente grande de datos.

De esta manera, si se observa la posición promedio, por ejemplo en dirección  $x$ , de una partícula atrapada en medio de un flujo que se mueve en esa misma dirección y se compara con la posición promedio de esa misma partícula atrapada pero con el fluido en reposo, podrá obtenerse un desplazamiento  $\Delta x$  de la posición promedio que es causado

por la fuerza de arrastre que ejerce el fluido cuando éste se mueve a través de la partícula (Figura 2.4). Como veremos en seguida, este desplazamiento  $\Delta x$  puede usarse para medir la velocidad de un flujo en la vecindad de una partícula atrapada. Una característica importante de dicho desplazamiento debido al flujo es que no está influenciado por el movimiento Browniano de la partícula, siempre y cuando las posiciones promedio de la partícula con y sin flujo se hayan obtenido de muestras estadísticamente grandes.



**Figura 2.4** Desplazamiento de la posición promedio de la partícula como efecto de la fuerza de arrastre del fluido. Diagrama realizado sin escala; el diámetro de haz gaussiano se encuentra exagerado.

Con la PO modelada como un resorte con cierta constante de rigidez en la dirección  $x$  (Ecuación 2.1), por ejemplo, y a partir de la ley de Stokes dada por la Ecuación 2.2 es posible medir experimentalmente, por medio de la Ecuación 2.3, la velocidad  $u$  de un flujo en dirección  $x$  en la vecindad de una partícula atrapada, siempre y cuando la posición promedio de la partícula en dicha dirección, antes y después de que el flujo sea inducido, la constante de rigidez  $k_x$  de la pinza y el coeficiente de arrastre  $\gamma$  de la partícula sean conocidos.

$$F_{x_{pinza}} = -k_x \Delta x, \quad (2.1)$$

$$F_{x_{arrastre}} = \gamma u, \quad (2.2)$$

$$u = \frac{k_x \Delta x}{\gamma}. \quad (2.3)$$

Debido a que para las velocidades y distancias características típicas en aplicaciones de microfluidos se tiene un muy bajo número de Reynolds, el coeficiente de arrastre en las Ecuaciones 2.2 y 2.3 puede considerarse como el dado por la ley de Stokes (Ecuación 2.4), sólo modificado por un factor  $\varepsilon$  que toma en cuenta efectos producidos por la posible interacción de la partícula atrapada con paredes no situadas a una distancia infinita de ella (Ecuación 2.5).

$$\gamma_0 = 6\pi\eta a, \quad (2.4)$$

$$\gamma = \gamma_0 \varepsilon. \quad (2.5)$$

En la Ecuación 2.4,  $\eta$  y  $a$  son la viscosidad del fluido y el radio de la partícula atrapada, respectivamente. En la Ecuación 2.5, el factor  $\varepsilon$  puede calcularse con la ley de



Faxén (Ecuación 2.6) que toma en cuenta el efecto sobre  $\gamma$  que tiene una pared situada a una distancia  $h$  de la partícula atrapada (Faxén 1923).

$$\varepsilon = \frac{1}{1 - (9a/16h) + (a^3/8h^3) - (45a^4/256h^4) - (a^5/16h^5) + \dots}. \quad (2.6)$$

Como las mediciones de velocidad en microfluidos se realizan típicamente entre superficies paralelas cercanas entre sí, puede ser útil calcular el factor  $\varepsilon$  considerando, mediante la ley de Faxén, el efecto superpuesto de las dos superficies paralelas sobre  $\gamma$  de una partícula atrapada a una distancia  $h$  de la superficie más cercana, estando las dos superficies separadas por una distancia  $t$  (Ecuación 2.7) (Buosciolo *et al.* 2004).

$$\varepsilon = \frac{1}{1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h}\right)^5} + \frac{1}{1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{t-h}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{t-h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{t-h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{t-h}\right)^5}. \quad (2.7)$$

Una característica de la velocidad medida con una PO usando el principio que se acaba de plantear es que dicha medición se basa en el desplazamiento de la posición promedio de una partícula atrapada como consecuencia del arrastre del fluido. Como ya se ha explicado, puede considerarse que para un número suficientemente grande de datos dicho desplazamiento no está influenciado por el movimiento Browniano de la partícula y, por lo tanto, la medición de velocidad tampoco. Lo anterior es de gran relevancia cuando se requiere medir velocidades para las que, usando determinado tamaño de partícula, se tiene gran influencia del movimiento Browniano, como suele ser el caso en algunas aplicaciones de microfluidos (Ladavac y Grier 2004; Leach *et al.* 2006; Terray *et al.* 2002).

### 2.2.2 Antecedentes del uso de pinzas ópticas en microvelocimetría

Aunque ya se han reportado métodos en los que se utilizan PO's para medir velocidad, la mayoría de ellos no se basan en la medición del desplazamiento de la posición promedio de una partícula atrapada como se ha propuesto aquí, sino que usan una PO con el fin de atrapar una partícula en un punto determinado para después soltarla, observar su movimiento y con ello determinar la velocidad del fluido en el punto donde se soltó la partícula (Di Leonardo *et al.* 2006; Knöner *et al.* 2005; Mushfique *et al.* 2008; Wu *et al.* 2010). Con este tipo de métodos se requiere forzosamente el uso de videomicroscopía, obteniendo información del movimiento de la partícula a una tasa mucho menor que con un detector de cuadrante, eliminando la posibilidad de medir otras magnitudes como la temperatura. Además, algunos de estos métodos (Knöner *et al.* 2005; Wu *et al.* 2010) mantienen las limitantes que se presentan con el uso de microvelocimetría por seguimiento de partículas (micro-VSP) en cuanto a la resolución alcanzable, puesto que en el caso de la medición de magnitudes de velocidad para las que se tiene gran influencia del movimiento Browniano, es necesario implementar un promedio temporal como el propuesto en la [Sección 1.4](#).

Nemet y Cronim-Golom (2002) proponen un método para medir viscosidad y velocidad al mismo tiempo. Consiste en hacer oscilar una partícula atrapada en una PO, lo cual se logra con un deflector optoacústico que hace oscilar la posición del foco del haz de atrapamiento a una determinada frecuencia. Las oscilaciones de la partícula están desfasadas de las del haz debido a la fuerza de arrastre provocada por el mismo movimiento de la partícula, dicho desfase se relaciona con la viscosidad a través de una constante de relajación, que se calcula por medio de la fase del segundo armónico del movimiento de la partícula. Cuando la partícula oscilante se encuentra dentro de un flujo, además del retraso en la fase de su movimiento, se producirá un desplazamiento de la posición promedio que tenía en el fluido estático, lo que agrega una componente a la frecuencia fundamental de oscilación de la partícula. Obteniendo información de las oscilaciones de la partícula por medio de amplificadores lock-in se determinan la viscosidad y la magnitud de velocidad en dirección de las oscilaciones. Debido a que el único parámetro que se determina antes de las mediciones de velocidad es la amplitud de las oscilaciones, el método sólo requiere una calibración, a pesar de que se cambie de fluido, se modifique la rigidez de la pinza o se trabaje con una partícula de diámetro diferente. A pesar de lo anterior, este método sólo es capaz de medir valores absolutos de velocidad y de hacerlo en la dirección de las oscilaciones. También requiere del uso de dos amplificadores lock-in.

Knöner *et al.* (2005) reportan un método para medir velocidad que consiste en mantener una partícula atrapada y medir el cambio producido en la señal eléctrica de un fotodetector de cuadrante (FDC) cuando se induce un flujo. De dicho cambio en la señal del FDC se obtiene la magnitud de la velocidad que hay en la vecindad de la partícula atrapada. Lo anterior es posible gracias a una calibración previa del fotodetector en la que se han medido los cambios en la señal del detector que se producen para diferentes velocidades conocidas. Es por ello que no es necesario conocer la viscosidad del fluido o la rigidez de la pinza. Sin embargo, es necesario llevar a cabo una calibración cada que la constante de rigidez de la pinza o el coeficiente de arrastre de la partícula cambie, como de hecho sucede al pretender medir velocidad en diferentes puntos a lo largo del eje de propagación del haz de atrapamiento (Eom *et al.* 2014). Por otro lado, el no hacer uso de la constante de rigidez de la pinza en las mediciones de velocidad le resta versatilidad al método.

Eom *et al.* (2014) reportan el único estudio encontrado en el que se determina la velocidad de un flujo en la vecindad de una partícula atrapada con una pinza óptica por medio de la fuerza de arrastre ejercida sobre ella, la cual es calculada a través del desplazamiento de la posición promedio de la partícula atrapada y la constante de rigidez de la pinza. Este método coincide con el bosquejado en el [Apartado 2.2.1](#). Este método es el elegido para usarse en este trabajo puesto que al hacer uso de la constante de rigidez de la pinza en las mediciones de velocidad es el más versátil: podría implementarse de tal forma que se obtuvieran mediciones de las tres componentes de velocidad, aunque a la fecha no hay trabajos que lo reporten, o de tal manera que fuera posible hacer mediciones de velocidad y temperatura al mismo tiempo auxiliándose del uso de un FDC, a pesar de que a la fecha no se han publicado estudios que reporten esta medición

simultánea aunque sí se han publicado estudios de medición de temperatura con PO (Peterman *et al.* 2003; Wan *et al.* 2009).

### 2.3 Métodos de obtención de parámetros experimentales

De acuerdo al principio planteado en el [Apartado 2.2.1](#), la medición de velocidad usando PO puede realizarse al conocer la constante de rigidez de la pinza así como el desplazamiento de la posición promedio de la partícula atrapada como efecto del arrastre del fluido.

En cuanto a la constante de rigidez de la pinza, podría considerarse que con el cálculo teórico de las fuerzas ejercidas sobre una partícula atrapada podría obtenerse el valor de dicha constante. Sin embargo, a pesar de que las fuerzas calculadas con el uso adecuado de las aproximaciones a óptica geométrica o esparcimiento de Rayleigh, o con la utilización de la teoría generalizada de Lorenz-Mie, pueden ser muy exactas, para que así sea es necesario que en los cálculos se tomen en cuenta con mucha precisión las condiciones experimentales bajo las que se da el atrapamiento (Rohrbach 2005; Rohrbach y Stelzer 2002). Lo anterior hace que en la práctica se prefiera obtener experimentalmente la constante de rigidez de una PO, con lo que se toman en cuenta, de forma implícita, muchas de las condiciones bajo las que se realiza el atrapamiento. La obtención experimental de la constante de rigidez de una PO parte de la observación del comportamiento de una partícula atrapada que puede lograrse por medio de videomicroscopía (Baek *et al.* 2007), con la ayuda de una cámara de video, o de detección en el plano focal posterior (DPFP), auxiliándose de un FDC (Allerma *et al.* 1998, [Apéndice B](#)). En ambos casos se pueden aprovechar diferentes características de dicho comportamiento para obtener la constante mencionada, existiendo para cada medio de observación diferentes métodos de obtención de  $k$  (Baek *et al.* 2007; Neuman y Block 2004).

En cuanto al desplazamiento de la posición promedio de la partícula atrapada, éste debe ser determinado de manera experimental para poder obtener mediciones experimentales de velocidad, teniéndose nuevamente como posibles medios de observación una cámara de video o un FDC. Sin embargo, en ninguno de los casos es posible medir el desplazamiento de la posición promedio en unidades apropiadas. Con el uso de cámara de video la medición se realiza en pixeles y su conversión a unidades de longitud más apropiadas puede lograrse de manera casi trivial al utilizar una regla con graduación micrométrica para cuantificar el número de pixeles contenidos entre dos de sus divisiones. Con el uso de FDC la medición del desplazamiento de la posición promedio se obtiene, a través del método de DPFP (Allerma *et al.* 1998, [Apéndice B](#)), como un cambio en el potencial eléctrico promedio de la señal generada por el detector. La conversión de este cambio en el potencial eléctrico promedio a unidades de longitud se hace a través de la determinación de un factor de calibración del FDC que no se obtiene de manera trivial. Dicho factor de calibración puede obtenerse de forma teórica (Allerma *et al.* 1998; Gittes and Smith 1998; Pralle *et al.* 1999; Rohrbach and Stelzer 2002b), enfrentándose a dificultades muy parecidas a las encontradas al tratar de obtener teóricamente la constante de rigidez de una PO. Es por lo anterior que en la práctica se

prefiere determinar el factor de calibración del fotodetector de manera experimental existiendo varios métodos reportados para lograrlo.

En los siguientes dos Apartados se explican los métodos más relevantes para la determinación experimental de la constante de rigidez de una PO y del factor de calibración de un FDC, asumiendo para este último que el sistema de detección está basado en el método de DPFP.

### 2.3.1 Métodos para obtener la constante de rigidez $k$ de una pinza óptica

#### 2.3.1.1 Método de equipartición

Para una partícula en equilibrio térmico que presenta movimiento Browniano puede considerarse, a través del teorema de equipartición, que su energía cinética promedio en dirección  $x$  ( $\langle E_{cinética_x} \rangle$ ) está dada por la Ecuación 2.8. Por otro lado, la energía potencial promedio de una partícula también en dirección  $x$  y debida a sus fluctuaciones de posición al estar atrapada en un potencial cuadrático ( $\langle E_{potencial_x} \rangle$ ) puede cuantificarse con la Ecuación 2.9. Considerando que la energía cinética asociada con el movimiento Browniano de una partícula atrapada en una PO es la única que produce su movimiento, la constante de rigidez en dirección  $x$  de una PO puede determinarse con la Ecuación 2.10 (Baek *et al.* 2007).

$$\langle E_{cinética_x} \rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad (2.8)$$

$$\langle E_{potencial_x} \rangle = \frac{1}{2} k_x \langle x^2 \rangle, \quad (3.9)$$

$$k_x = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle}. \quad (2.10)$$

En las Ecuaciones 2.8-2.10  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta del medio en que la partícula se encuentra suspendida,  $\langle x^2 \rangle$  es la varianza de posición de la partícula atrapada en dirección  $x$  y  $k_x$  es la constante de rigidez de la PO en dirección  $x$ .

Como se puede observar de la Ecuación 2.10, para la determinación de la constante de rigidez con el método de equipartición no es necesario conocer la geometría de la partícula o la viscosidad del medio en que ésta se encuentra suspendida, sin embargo, para que por medio de ella se obtenga la constante de rigidez en unidades adecuadas es necesario que la varianza de posición de la partícula se encuentre en unidades de longitud al cuadrado, por lo que, en caso de usar un fotodetector de cuadrante, es necesario que se haya determinado el factor de calibración de éste. Por otro lado, con el filtrado antialias (Apéndice C) típico que se hace a la señal producida por el FDC, puede producirse una subestimación de la varianza de posición dando lugar a una sobreestimación de la constante de rigidez. Los dos inconvenientes anteriores pueden evitarse al utilizar como medio de observación una cámara de video en vez de un FDC.

### 2.3.1.2 Método basado en la distribución de Boltzmann

La distribución de Boltzmann (Ecuación 2.11) puede describir la probabilidad  $p(x)dx$  de encontrar una partícula browniana dentro de las posiciones  $x$  y  $x + dx$  cuando se encuentra atrapada dentro de un potencial  $E(x)$  como en el caso de una PO (Florin *et al.* 1998).

$$p(x)dx = Ce^{-\frac{E(x)}{k_B T}}. \quad (2.11)$$

En la Ecuación 2.11,  $C$  se usa para asegurar que se cumpla que  $\int p(x)dx = 1$  y resolviéndola para  $E(x)$  se puede obtener la forma del potencial de atrapamiento una vez medida la densidad de probabilidad  $p(x)$ :

$$E(x) = -k_B T \ln p(x) + k_B T \ln C, \quad (2.12)$$

donde el segundo término del lado derecho representa una constante aditiva que puede ser ignorada.

Además de contar con las ventajas que tiene el método de equipartición, en el sentido de que no necesita del conocimiento de la geometría de la partícula o la viscosidad del medio en que ésta se encuentra suspendida, el método basado en la distribución de Boltzmann presenta una ventaja adicional: se puede suponer conocida la forma del potencial de atrapamiento y reemplazar  $E(x)$  en la Ecuación 2.12 por la forma supuesta para determinar el valor de la constante de rigidez de la PO mediante un ajuste (como de hecho hacen Florin *et al.* (1998) al suponer  $E = (1/2)k_x x^2$ ) y, derivando la expresión resultante de dicho ajuste, puede determinarse la región sobre la que es válido suponer un comportamiento lineal de la fuerza ejercida por la PO sobre la partícula atrapada. Sin embargo, debe notarse que la densidad de probabilidad  $p(x)$  debe estar determinada en función de la posición con unidades de longitud adecuadas, por lo que para determinar la constante de rigidez de una PO con este método al usar un FDC como medio de observación, es necesario que se haya determinado el factor de calibración de éste.

### 2.3.1.3 Método de fuerza de arrastre

Cuando se tiene la capacidad de inducir flujos constantes estando atrapada una partícula cuyo coeficiente de arrastre es conocido, puede recurrirse a la fuerza de arrastre dada por la Ecuación 2.2 para obtener la constante de rigidez de una PO (Baek *et al.* 2007). Un flujo constante como el requerido puede inducirse de forma relativa a la partícula atrapada al mover a velocidad constante y conocida, en dirección  $x$  por ejemplo, la muestra donde se realiza el atrapamiento. Lo anterior puede lograrse con la ayuda de una estación de traslación movida por actuadores piezoeléctricos. Midiendo el desplazamiento  $\Delta x$  que la partícula presenta con respecto al centro del potencial de atrapamiento como efecto de la fuerza de arrastre en la dirección del flujo ( $F_{x\text{arrastre}}$ ), puede obtenerse la constante de rigidez de la PO con la Ecuación 2.13.

$$k_x = \frac{F_{x\text{arrastre}}}{\Delta x}. \quad (2.13)$$

Al igual que con los dos métodos anteriores, con este método es necesario tener un medio de observación calibrado de tal forma que el desplazamiento producido por la fuerza de arrastre se encuentre en unidades adecuadas para su uso en la Ecuación 2.13, lo que se logra de forma muy simple al utilizar videomicroscopía para observar a la partícula atrapada.

### **2.3.2 Métodos para obtener el factor de calibración $\beta$ de un fotodetector de cuadrante**

De manera similar a como se supone para la constante de rigidez de una PO, puede considerarse que el factor de calibración  $\beta_i$  de un FDC tiene un comportamiento lineal en cada una de las direcciones  $i = x, y, z$  para pequeños desplazamientos, siendo  $x, y$  y  $z$  direcciones mutuamente perpendiculares, una de ellas alineada con la dirección de propagación del haz de atrapamiento. Los métodos mencionados en este Apartado, así como en el siguiente, suponen válidas las consideraciones mencionadas.

#### **2.3.2.1 Método de la partícula “pegada”**

Uno de los métodos más ampliamente usados para obtener el factor de calibración de un FDC consiste en monitorear el movimiento controlado de una partícula adherida al cubreobjetos de la muestra donde se realiza el atrapamiento, grabando la señal proveniente del fotodetector al tiempo que se captura el video de dicho movimiento (Allersma *et al.* 1998; Eom *et al.* 2014). El movimiento controlado de la partícula adherida puede obtenerse al hacer oscilar siguiendo una función triangular a la muestra en la dirección en la que se desea conocer el factor de calibración (Allersma *et al.* 1998), asegurándose de que la partícula se mueva en el plano de atrapamiento y de que pase justo por el centro del potencial creado por la PO. De las pendientes observadas tanto en la señal del detector como en el desplazamiento de la partícula grabada en el video justo cuando ésta pasa por el centro del potencial, una en volts por segundo y la otra en micrómetros por segundo, se obtiene el factor de calibración del FDC.

Este método tiene una limitación importante: las condiciones bajo las que se determina el factor de calibración pueden alejarse de las condiciones bajo las que una partícula se mantiene atrapada debido, por un lado, a la interacción entre la partícula y el cubreobjetos y, por otro lado, a las aberraciones producidas en el haz de atrapamiento al utilizar un objetivo de microscopio de inmersión en aceite (Buosciolo *et al.* 2004). Además, la correcta determinación del factor de calibración con este método depende fuertemente de la capacidad que se tenga para hacer que la partícula adherida al cubreobjetos pase justo por el centro del potencial y se mueva justo sobre el plano en que se da el atrapamiento (Buosciolo *et al.* 2004).

#### **2.3.2.2 Método de arrastre**

Una característica deseable en un método usado para obtener el factor de calibración de un FDC es la capacidad para obtener dicho factor justo en el lugar donde se realiza el atrapamiento, sobre todo cuando se utilizan objetivos de microscopio de inmersión en aceite para realizar el atrapamiento, pues una dependencia del factor de calibración del FDC respecto a la profundidad se encuentra asociada a ellos (Pesce *et al.* 2005).

Pesce *et al.* (2005) proponen un método para obtener el factor de calibración de un FDC en cierta dirección que consiste en atrapar una partícula a cierta profundidad medida desde el cubre objetos de la muestra y, bajo estas condiciones, mover la muestra a velocidad constante en la dirección en que el factor de calibración quiere ser determinado, mientras se graba un video del cambio de posición de la partícula debido al arrastre del fluido así como el cambio de potencial eléctrico en la señal enviada por el FDC originado por el cambio de posición de la partícula (Figura 2.5). El cociente del cambio de posición de la partícula y del cambio de potencial eléctrico en la señal enviada por el detector proporciona el factor de calibración del detector. Lo anterior se repite modificando la velocidad a la que se mueve la muestra para asegurarse de que se está trabajando dentro de la región en la que el detector tiene un comportamiento lineal (Figura 2.6).

A pesar de que con este método es posible obtener el factor de calibración del FDC justo bajo las mismas condiciones en que la partícula es atrapada, para que esto sea posible debe recurrirse al procesamiento de imágenes obtenidas mediante videomicroscopía, generándose un costo computacional alto.

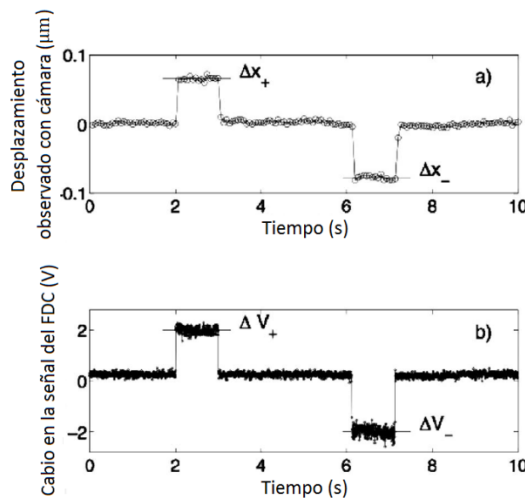


Figura 2.5 Desplazamiento de la partícula atrapada producido durante el movimiento de la muestra a) visto con cámara de video y b) por medio de la señal generada por el FDC. Figura tomada y adaptada de Pesce *et al.* (2005).

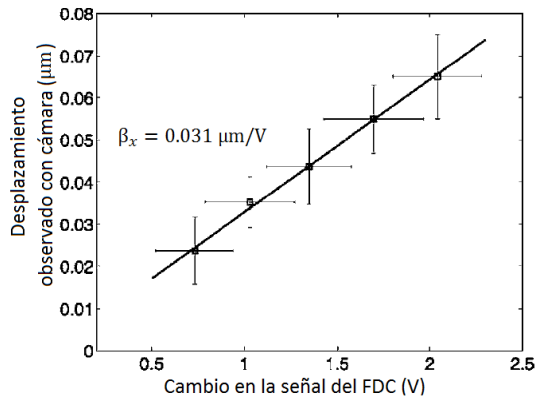


Figura 2.6 Desplazamiento de la partícula atrapada producido durante el movimiento de la muestra visto con cámara de video en función del cambio en la señal producida por el detector, lo anterior para velocidades de traslación de la muestra de entre 120 y 260  $\mu\text{m/s}$ . Figura tomada y adaptada de Pesce *et al.* (2005).

### 2.3.3 Métodos para obtener $k$ y $\beta$ simultáneamente

Se han propuesto métodos mediante los que es posible determinar de forma simultánea la constante de rigidez de una PO y el factor de calibración de un FDC. La mayoría de estos métodos se basan en el ajuste de la densidad espectral de potencia (DEP) del movimiento de una partícula atrapada observada experimentalmente a la DEP teórica esperada para las condiciones experimentales. Lo anterior se debe a que por medio de dicho ajuste se pueden obtener dos parámetros independientes, donde uno de ellos puede ser relacionado con la constante de rigidez de la PO y el otro con el factor de calibración del FDC. Una ventaja de este tipo de métodos es que la determinación de los parámetros de interés se realiza bajo las condiciones en que la partícula es atrapada, mientras que no es necesario recurrir al procesamiento de imágenes como con el método de arrastre.

La descripción teórica más simple de la dinámica de una partícula atrapada en una PO puede hacerse usando la ecuación de Langevin aplicada al análisis en una dimensión de una partícula con masa  $m$  cuya trayectoria es  $x(t)$  (Ecuación 2.14) (Berg-Sørensen *et al.* 2004).

$$m\ddot{x}(t) + \gamma\dot{x}(t) + k_x x(t) = F_T(t). \quad (2.14)$$

En la Ecuación 2.14,  $\gamma$  representa el coeficiente de fricción de la partícula atrapada dado por la ley de Stokes ( $\gamma_0$  en la Ecuación 2.4) para el caso más simple,  $k_x$  representa la constante de rigidez de la PO en dirección  $x$ , mientras que  $F_T(t) = (2k_B T \gamma)^{1/2} \eta(t)$  representa una fuerza aleatoria con distribución normal ejercida sobre la partícula como efecto de la energía térmica del fluido, en la que  $\eta(t)$  presenta las propiedades de aleatoriedad dadas en la Ecuación 2.15 para todo  $t$  y  $t'$ .

$$\langle \eta(t) \rangle = 0; \quad \langle \eta(t) \eta(t') \rangle = \delta(t - t'). \quad (2.15)$$

Siguiendo la deducción hecha por Berg-Sørensen *et al.* (2004), se puede definir la frecuencia de corte  $f_c$  como

$$f_c \equiv k / 2\pi\gamma \quad (2.16)$$

y utilizar la ecuación de Einstein (Ecuación 2.17) que establece el coeficiente de difusión  $D$  de una partícula Browniana

$$D = k_B T / \gamma \quad (2.17)$$

para escribir la Ecuación 2.14 en la forma dada por la Ecuación 2.18, al considerar que la fuerza de inercia es pequeña en comparación con la fuerza de fricción, lo que es una buena aproximación para muy bajos números de Reynolds como los involucrados de forma típica en microfluidos.

$$\dot{x}(t) + 2\pi f_c x(t) = (2D)^{1/2} \eta(t). \quad (2.18)$$

De la solución en el dominio de la frecuencia de la Ecuación 2.18, utilizando las transformadas de Fourier de  $x(t)$  y  $\eta(t)$ , puede obtenerse DEP teórica promedio,  $S_x(f)$ ,



del movimiento de una partícula atrapada en una PO, que para  $f > 0$  Hz corresponde a la Lorentziana dada por la Ecuación 2.19 (Berg-Sørensen *et al.* 2004; Buosciolo *et al.* 2004).

$$S_x(f) = \frac{D}{\pi^2(f_c^2 + f^2)} = \frac{k_B T}{\pi^2 \gamma (f_c^2 + f^2)}. \quad (2.19)$$

Se debe resaltar que la forma Lorentziana de  $S_x(f)$  proviene de la consideración de que la DEP, que está asociada con un fenómeno aleatorio, corresponde al promedio sobre una cantidad de observaciones suficiente para que dicho fenómeno realmente se aprecie como uno que obedece a una distribución normal.

Por otro lado, de la observación experimental del movimiento de una partícula atrapada en una PO puede obtenerse en forma discreta la DEP experimental definida como  $P_{exp} \equiv 2 |\tilde{x}_{exp}|^2 / T_{med}$ , en donde  $\tilde{x}_{exp}$  es la transformada rápida de Fourier (TRF) del movimiento de la partícula observado durante un experimento y  $T_{med}$  es el periodo de observación.

Debido a que los datos que forman  $P_{exp}$  no siguen una distribución normal como la considerada para la obtención de la Ecuación 2.19 (Gittes and Smith 1997; Press *et al.* 1992), es necesario encontrar una manera de obtener una DEP experimental con datos que sigan dicha distribución y así pueda ser ajustada a la DEP teórica dada por la Ecuación mencionada, en el caso más simple, o por alguna otra (Berg-Sørensen *et al.* (2004); Tolic-Norrelke *et al.* 2006). Una forma de hacer lo anterior es obtener una DEP experimental promedio a partir de un número suficiente de DEP's experimentales independientes ( $P_{prom} = \langle P_{exp} \rangle$ ) (Gittes and Smith 1997; Press *et al.* 1992), aunque existen otras opciones para obtener una DEP que realmente siga una distribución normal.

Como se mencionó, parte del interés por ajustar la DEP experimental a la DEP teórica proviene de la posibilidad de obtener mediante dicho ajuste un parámetro asociado a la constante de rigidez de la PO. De acuerdo a lo planteado hasta ahora dicho parámetro de ajuste corresponde a la frecuencia de corte  $f_c$  cuya relación con la constante de rigidez está dada por la Ecuación 2.16. Debido a lo anterior es que para la determinación de la constante de rigidez de una PO con un método basado en la DEP del movimiento de una partícula atrapada se requiere de un medio de observación con un ancho de banda lo suficientemente grande como para obtener una DEP experimental que abarque frecuencias suficientemente alejadas de la frecuencia de corte. Es por ello que se prefiere usar un FDC como medio de observación cuando se quiere obtener la constante de rigidez de una PO por medio de un método basado en la DEP en lugar de una cámara de video.

### 2.3.3.1 Método propuesto por Allersma y colaboradores

Allerma *et al.* (1998) proponen la obtención del factor de calibración del FDC con base en la medición de la altura  $P_{f^2}$  de la meseta observada a altas frecuencias ( $f \gg f_c$ ) cuando la DEP experimental es multiplicada por el cuadrado de la frecuencia (Figura 2.7). Como el valor teórico de la altura de la meseta mencionada es  $k_B T / (6\pi^3 \eta a)$  el factor de calibración puede obtenerse con la Ecuación 2.20.

$$\beta = \sqrt{\frac{6\pi^3\eta a P_{f^2}}{k_B T}}. \quad (2.20)$$

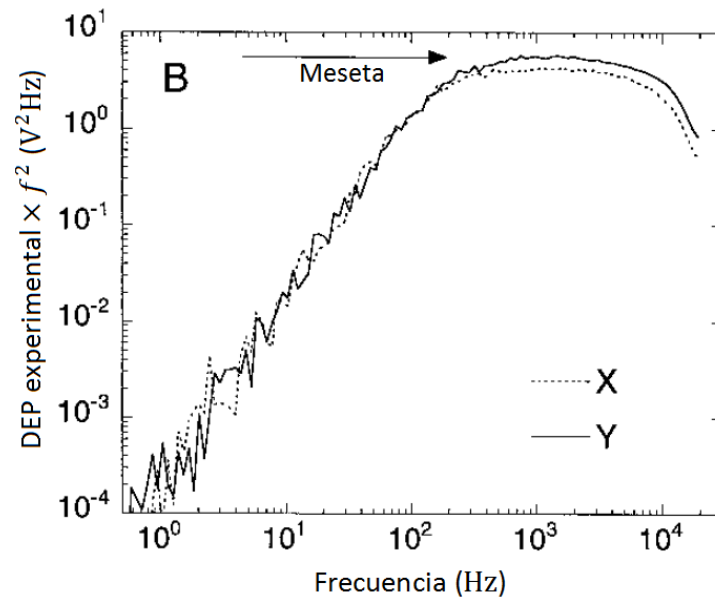


Figura 2.7 Meseta observada al multiplicar la DEP experimental por el cuadrado de la frecuencia. Figura tomada y adaptada de Allersma *et al.* 1998.

En cuanto a la constante de rigidez, Allersma *et al.* (1998) proponen obtenerla por medio de la frecuencia de corte determinada al ajustar la DEP experimental a la DEP teórica dada por la Ecuación 2.19.

Una limitante importante de este método es que la correcta determinación del factor de calibración del FDC depende de la obtención adecuada de la DEP experimental a altas frecuencias, siendo que es precisamente a altas frecuencias donde existen dificultades para obtener una DEP experimental adecuada debido a los efectos de alias, de los filtros usados para prevenir el fenómeno de alias o de la suposición de que el coeficiente de fricción de la Ecuación 2.14 es independiente de la frecuencia (Berg-Sørensen *et al.* 2004; Gittes and Smith 1997; Press *et al.* 1992).

### 2.3.3.2 Método propuesto por Berg-Sørensen y colaboradores

Berg-Sørensen *et al.* (2004) remarcan la necesidad de que cada uno de los valores que conforman la DEP experimental provenga de un conjunto de datos con distribución normal para que así ésta pueda ser ajustada a una curva teórica cuya deducción se base en el comportamiento promedio de la fuerza debida a la energía térmica del fluido. Para lograr lo anterior se puede reemplazar un determinado número de valores correspondientes a frecuencias discretas sucesivas de la DEP por un solo valor igual al promedio de todos ellos, el cual se atribuye al valor promedio de frecuencias discretas sucesivas consideradas. A este procedimiento se le conoce en inglés como *blocking* (Gittes and Smith 1997; Press *et al.* 1992) y es usado por Berg-Sørensen *et al.* (2004) para generar una DEP experimental con valores provenientes de una distribución normal de datos. Para poder hacer un ajuste correcto de los datos experimentales, además de lo anterior, Berg-

Sørensen *et al.* (2004) eliminan la correlación existente entre las diferentes señales generadas por el FDC (fenómeno conocido en inglés como *cross-talk*) por medio de una transformación lineal.

Además de usar el *blocking* y eliminar el *cross-talk* entre señales del FDC para obtener una adecuada DEP experimental, Berg-Sørensen *et al.* (2004) desarrollan una expresión mejorada para la DEP teórica promedio que sustituye a la dada por la Ecuación 2.19 y cuya deducción se basa en la consideración de que el coeficiente de arrastre de una partícula atrapada en una PO no es constante, sino que depende de la frecuencia a la cual se mueve dicha partícula. Para el desarrollo de la expresión mejorada de la DEP teórica, Berg-Sørensen *et al.* (2004) consideran también que el factor de corrección  $\varepsilon$ , necesario para tomar en cuenta la interacción entre una partícula atrapada en una PO y una pared cercana al punto de atrapamiento, es dependiente de la frecuencia al basarse en una extensión de la ley de Faxén para una esfera con movimiento oscilatorio. Además, Berg-Sørensen *et al.* (2004) consideran la modificación de la DEP teórica por efecto de los filtros antialias utilizados al adquirir la señal del FDC y por la respuesta que éste tiene al trabajar con longitudes de onda que se encuentran dentro de la región infrarroja (Berg-Sørensen *et al.* 2003).

Todos estos fenómenos que afectan el adecuado ajuste con el que se determinan los parámetros que proporcionan la constante de rigidez de una PO y el factor de calibración de un FDC son estudiados por Berg-Sørensen *et al.* (2004) e implementados en un programa de Matlab por el mismo grupo de investigación (Tolić-Nørrelykke *et al.* 2004).

Los parámetros que Berg-Sørensen *et al.* (2004) obtienen del ajuste de la adecuada DEP experimental a la expresión de la DEP teórica mejorada son la frecuencia de corte en Hertz, relacionada con la constante de rigidez de la pinza por medio de la Ecuación 2.16, y el coeficiente de difusión  $D_V$  en unidades arbitrarias (ya sea  $1/s$  o  $V^2/s$  dependiendo de si las señales del FDC están o no normalizadas), que por medio de la Ecuación 2.21 puede proporcionar el factor de calibración del FDC.

$$\beta = \sqrt{\frac{D}{D_V}}. \quad (2.21)$$

### 2.3.3.3 Método propuesto por Tolić-Nørrelykke y colaboradores

Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006) reportan un método para determinar simultáneamente la constante de rigidez de una PO y el factor de calibración de un FDC. El método se basa en la DEP que se observa como producto de la superposición del movimiento oscilante de una partícula atrapada y el aleatorio originado por la energía térmica del fluido. El primero se produce con la inducción de un flujo oscilatorio relativo a la partícula, causado por el movimiento sinusoidal de la muestra donde se realiza el atrapamiento. La ecuación de Langevin para el caso de una partícula con masa despreciable por la que pasa un flujo con cierta velocidad (Ecuación 2.22) describe de la forma más simple la dinámica de la partícula atrapada bajo la situación descrita.

$$\gamma[\dot{x}(t) - u(t)] + k_x x(t) = F_T(t). \quad (2.22)$$

En la Ecuación 2.22  $x(t)$  representa la posición de la partícula atrapada en dirección de las oscilaciones,  $u(t)$  representa la velocidad del flujo inducido por el movimiento senoidal  $x_{muestra}(t)$  de la muestra (Ecuación 2.23) que puede ser tomada como  $\dot{x}_{muestra}(t)$  para bajas frecuencias de oscilación y muestras con pequeñas separaciones entre portaobjetos y cubreobjetos,  $\gamma$  representa el coeficiente de arrastre de la partícula atrapada dado por la ley de Stokes ( $\gamma_0$  en la Ecuación 2.4) para el caso más simple,  $k_x$  representa la constante de rigidez de la PO en dirección de las oscilaciones y  $F_T(t)$  representa la fuerza aleatoria ejercida sobre la partícula por efecto de la energía térmica del fluido.

$$x_{muestra}(t) = A \text{sen}(2\pi f_{muestra} t). \quad (2.23)$$

En la Ecuación 2.23  $A$  y  $f_{muestra}$  son la amplitud y frecuencia de oscilación de la muestra respectivamente.

Como la Ecuación 2.22 es lineal puede ser resuelta en el dominio de la frecuencia como la suma de dos fenómenos independientes, quedando la DEP teórica de la posición de la partícula atrapada como la suma de dos términos: el correspondiente al movimiento aleatorio de la partícula descrito por una Lorentziana con frecuencia de corte  $f_c$  (Ecuación 2.19 para el caso más simple) y el correspondiente al movimiento oscilatorio dado por la Ecuación 2.24.

$$P_{muestra} = \frac{A^2}{2(1 + f_c^2/f_{muestra}^2)} \delta(f - f_{muestra}). \quad (2.24)$$

Integrando la Ecuación 2.24 puede obtenerse la potencia total teórica de la señal generada por el detector atribuible a las oscilaciones de la muestra (Ecuación 2.25).

$$P_{total\text{teórica}} = \frac{A^2}{2(1 + f_c^2/f_{muestra}^2)}. \quad (2.25)$$

Por otro lado, puede obtenerse una potencia total experimental  $P_{total\text{exp}}$  atribuible a las oscilaciones de la muestra integrando sobre la DEP observada directamente de la señal entregada por el FDC. Esta integral experimental está dada por la multiplicación del valor del pico observado en la DEP experimental a la frecuencia de oscilación de la muestra y el espaciado entre las frecuencias discretas que determinan la resolución de la DEP cuando el periodo de muestreo es un múltiplo entero de  $1/f_{muestra}$  (Gittes y Smith 1997; Press *et al.* 1992).

El factor de calibración del FDC puede obtenerse entonces de la siguiente Ecuación:

$$\beta = \sqrt{\frac{P_{total\text{teórica}}}{P_{total\text{exp}}}}. \quad (2.26)$$

Para la obtención de la constante de rigidez de la PO Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006) siguen el método planteado por Berg-Sørensen *et al.* (2004).

### 2.3.3.4 Método basado en filtros digitales

En el [Apéndice D](#) se demuestra la relación que existe entre la varianza de una señal y su DEP, y se plantea el uso de filtros digitales, vistos como sistemas lineales e invariantes en el tiempo, para obtener la varianza total así como el valor constante de la DEP de una señal  $x(t)$  cuya potencia se encuentra equitativamente distribuida sobre todas las frecuencias muestreadas. Lo anterior se basa en el valor de la varianza de una señal  $y(t)$  obtenida mediante el filtrado de  $x(t)$  y en el concepto del ancho de banda equivalente del filtro utilizado ([Apéndice D](#)).

A pesar de que la DEP de una señal  $v(t)$  proveniente de la observación del movimiento de una partícula atrapada en una PO no se encuentra equitativamente distribuida como en las señales supuestas en el [Apéndice D](#) sino que, bajo las consideraciones más simples, está dada por una Lorentziana, es posible obtener la DEP y la varianza total de  $v(t)$  a partir de las varianzas observadas en las señales  $w(t)$  procedentes de procesos de filtrado como los propuestos en dicho [Apéndice](#) si se considera que la banda de paso del filtro utilizado es lo suficientemente pequeña, de tal forma que la variación de la DEP dentro de ésta puede tomarse como despreciable. De esta manera la varianza  $\langle (w(t) - \bar{w}(t))^2 \rangle$  de la señal filtrada  $w(t)$  estará relacionada, a través de la Ecuación 2.27, con el ancho de banda equivalente  $h_e$  del filtro utilizado y con el valor  $\rho$  de la DEP que corresponde a la frecuencia a la que fue sintonizado el filtro usado sobre la señal  $v(t)$  para obtener  $w(t)$  (Figura 2.8).

$$\rho = \frac{\langle (w(t) - \bar{w}(t))^2 \rangle}{h_e} \quad (2.27)$$

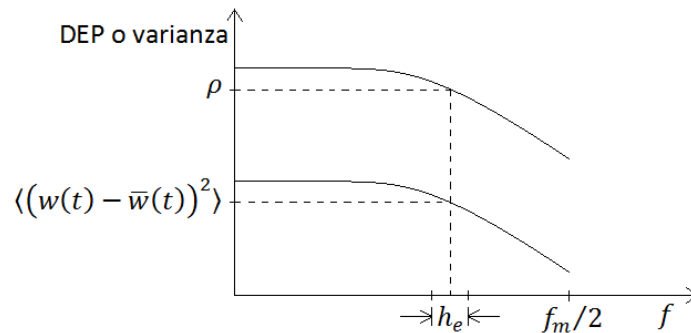


Figura 2.8 Relación entre la curva de densidad de varianza y la construida con las varianzas de la señal original filtrada con un filtro sintonizado con frecuencias crecientes.

Recorriendo el filtro a lo largo del ancho de banda de la señal  $v(t)$ , que corresponde a la señal generada por un FDC al estar una partícula atrapada en una PO, pueden obtenerse valores  $\rho$  de la DEP a diferentes frecuencias con los que se puede realizar un ajuste a la Lorentziana esperada. Por un lado, se puede obtener la constante de rigidez de la PO a partir de los parámetros de ajuste, por otro, la integración de la curva proveniente del ajuste proporciona la varianza total de la señal  $v(t)$ . A partir de la varianza total de la señal  $v(t)$  y de la varianza de posición de la partícula  $\langle (x(t) - \bar{x}(t))^2 \rangle$ , relacionada teóricamente con la constante de rigidez  $k$  determinada con el ajuste mencionado

(Ecuación 2.28), puede obtenerse el factor de calibración del FDC mediante la Ecuación 2.29.

$$\langle (x(t) - \bar{x}(t))^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_x}. \quad (2.28)$$

$$\beta = \sqrt{\frac{\langle (x(t) - \bar{x}(t))^2 \rangle}{\langle (v(t) - \bar{v}(t))^2 \rangle}}. \quad (2.29)$$

Una ventaja de obtener la varianza total de la señal  $v(t)$  integrando la curva construida con el ajuste a la Lorentziana de los valores de  $\rho$ , correspondientes a las señales obtenidas mediante filtrado, es precisamente que dicha varianza se obtiene del ajuste de los datos experimentales que deberíamos observar haciendo a un lado contribuciones a la varianza de la señal  $v(t)$  que no provengan del fenómeno de interés.

Por otro lado, el proceso de filtrado involucra, para la obtención de un solo valor de  $\rho$ , la contribución de  $h_e T_m$  frecuencias discretas comprendidas dentro de la banda equivalente del filtro digital, siendo  $T_m$  el periodo total de muestreo de la señal discreta  $v(t)$ . Conforme se incrementa el valor de  $h_e T_m$ , los valores  $\rho$  de la DEP empiezan a observarse como provenientes de una distribución normal de datos, lo que es un requisito importante para hacer un ajuste adecuado de la DEP experimental a la DEP teórica.

Además, a diferencia del método propuesto por Berg-Sorensen *et al.* (2004), es posible determinar el coeficiente de difusión de la partícula atrapada, determinando su desplazamiento cuadrático medio una vez que el factor de calibración del FDC se ha obtenido de forma independiente a él por medio de la Ecuación 2.29.

Hasta aquí se ha expuesto de manera conceptual la forma de medir velocidad utilizando una PO. También se han explicado los métodos más relevantes por medio de los que es posible obtener experimentalmente los parámetros que caracterizan una PO. Algunos de estos métodos fueron implementados con la finalidad de obtener mediciones experimentales de velocidad con una PO. La metodología seguida para lograr lo anterior se describe en el siguiente [Capítulo](#).

# Capítulo 3: Implementación del sistema de medición de velocidad

## 3.1 Arreglo experimental

La Figura 3.1 muestra un esquema del arreglo experimental con el que se determinaron los perfiles de velocidad reportados en el [Capítulo 4](#). En dicho arreglo, el láser LA (longitud de onda de 532 nm, Opus532 de Laser Quantum) proporciona la luz coherente necesaria para realizar el atrapamiento con una variación en la potencia entregada menor al 2% para cualquier potencia de salida ajustada; un telescopio compuesto por las lentes L1 y L2 (lentes plano-convexas con distancia focal de 25.4 mm y 125 mm respectivamente) es utilizado para aumentar casi 5 veces el diámetro original del haz, para así sobrellenar la pupila de entrada del objetivo de microscopio de atrapamiento OM1 (UPlanApo 100x/1.35 Oil Iris, distancia de trabajo de 0.1 mm, de Olympus) y facilitar la obtención de una trampa estable en 3-D (Ashkin 1992); el sistema de iluminación, compuesto por la lámpara incandescente LI (QTH10 de Thorlabs), la lente L3 (biconvexa con distancia focal de 230 mm) y el objetivo de microscopio OM2 (Plan 20x/0.4, distancia de trabajo de 1.2 mm, de Nikon), permite grabar videos con tiempos de exposición de 1 ms y hasta 750 cuadros por segundo con un tamaño de imagen de 128 por 96 pixeles utilizando la cámara C (PL-B776F de PixeLINK); el objetivo de microscopio OM2 sirve también para formar un telescopio con el objetivo OM1 y así poder captar la luz esparcida por una partícula que se encuentra atrapada en la pinza óptica (PO); el divisor de haz DH (50% de transmisión y 50% de reflexión, EBS1 de Thorlabs) permite el paso de una parte de la luz incandescente hacia el canal, al mismo tiempo que refleja parte de la luz láser captada por el microscopio OM2 hacia la lente L5 (biconvexa de 35 mm de distancia focal) que se encuentra a una distancia de 75 mm tanto del plano focal posterior del objetivo OM2 como del área activa del fotodetector de cuadrante FDC (PDQ80A de Thorlabs) para cumplir con el arreglo que exige el método de detección en el plano focal posterior (DPFP, [Apéndice B](#)); el filtro “pasa banda” FPB (FB550-40 de Thorlabs) sirve para evitar que la mayoría de los rayos provenientes de la lámpara incandescente que se reflejan en el objetivo OM2 lleguen al fotodetector, mientras que la finalidad del filtro neutro FN2 (NE03A de Thorlabs) es regular la cantidad de luz esparcida por una partícula atrapada que llega a la superficie activa del FDC para así evitar la saturación de este último; el filtro neutro FN1 (NE10A de Thorlabs) cumple la función de atenuar con un factor de 10 las reflexiones de los diferentes componentes ópticos que de otra manera regresarían a la cavidad del láser afectando su estabilidad; el espejo dicróico ED (DMPLP605 de Thorlabs) permite que la mayor parte de la intensidad de la luz láser que llega a dicho espejo sea direccionada hacia el objetivo OM1 y que la mayor parte de la componente roja de la luz incandescente llegue a la cámara C por medio de la lente L4 (biconvexa con 100 mm de distancia focal) que lleva la imagen de la muestra formada por el objetivo de microscopio OM1 hasta dicha cámara; los diafragmas de iris DI1 y DI2 se utilizan para controlar la cantidad de luz coherente o incandescente que llega, respectivamente, a la parte posterior del objetivo OM1 u OM2; el filtro “pasa largas” FPL (FEL0600 de Thorlabs) se usa para evitar que

la luz verde reflejada por el objetivo OM1 llegue a la cámara C y la sature; la posición del microcanal MC (microcanal hecho en el laboratorio utilizando un portaobjetos, un cubreobjetos y cinta de doble pegamento, cuyas dimensiones son de  $86.4 \pm 4.5 \mu\text{m}$  de profundidad, 5.8 mm de ancho y 32 mm de largo, de acuerdo con la Figura 3.2), es ajustada por medio de la estación de traslación de tres ejes ET (MAX301 de Thorlabs) que en dirección  $z$  puede ser manipulada con resolución de 5 nm por medio del controlador del actuador piezoeléctrico CAP-z (TPZ001 de Thorlabs) que funciona en lazo cerrado al recibir retroalimentación del lector del sensor de posición LSP-z (TSG001 de Thorlabs) y en las direcciones  $x$  y  $y$  puede ser manipulada con resolución de 20 nm por medio de los controladores de actuador piezoeléctrico CAP-x y CAP-y (ambos TPZ001 de Thorlabs), respectivamente; el controlador CAP-x es alimentado por una señal obtenida con el generador de funciones GF (72-6644 de Tenma) para obtener, si así se requiere, un movimiento oscilatorio del microcanal en dirección  $x$  con la forma de la señal alimentada; las señales generadas por el fotodetector de cuadrante FDC son amplificadas y filtradas por el circuito de amplificación y filtrado antialias CAF (Apéndice C) para después ser enviadas al osciloscopio O (DPO 4104B de Tektronix) donde pueden ser grabadas; por último, la bomba de infusión BI (KDS200 de KD Scientific) permite la inducción de flujo al interior del microcanal a través de la manguera M al usar una jeringa comercial.

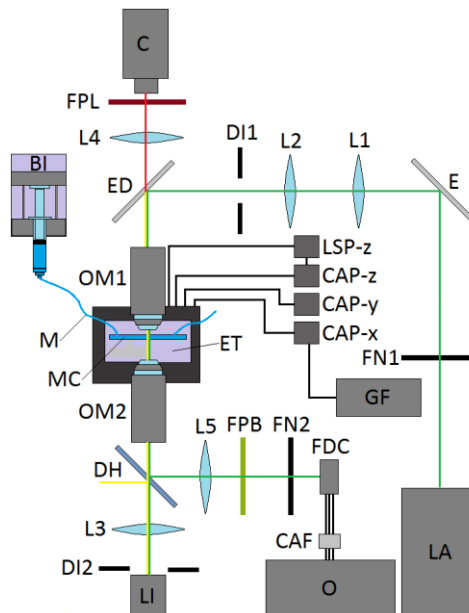


Figura 3.1 Esquema del arreglo utilizado en la realización de mediciones de velocidad.

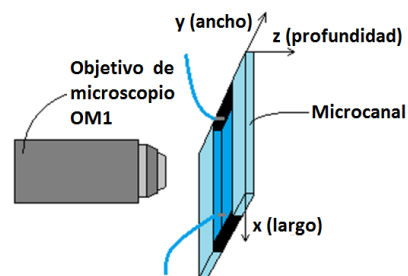


Figura 3.2 Esquemas de la orientación del microcanal MC de la Figura 3.1.



### 3.2 Metodología experimental

Con el arreglo experimental descrito en la [Sección 3.1](#) se realizaron varias series de experimentos. En algunas de esas series se utilizaron partículas con diámetro de 1  $\mu\text{m}$  mientras que en otras se usaron partículas de 0.5  $\mu\text{m}$ . Así mismo, en algunas se estudió el comportamiento de la velocidad del fluido a diferentes profundidades del microcanal pero manteniendo un flujo constante, mientras que en otras se estudió el comportamiento de la velocidad en función del flujo inducido para una profundidad constante. También se hicieron dos series de experimentos para observar el comportamiento de los principales parámetros de la PO a diferentes potencias y tamaños de partícula, manteniendo constante la profundidad. El esquema de la Figura 3.3 muestra gráficamente la organización de los experimentos realizados.

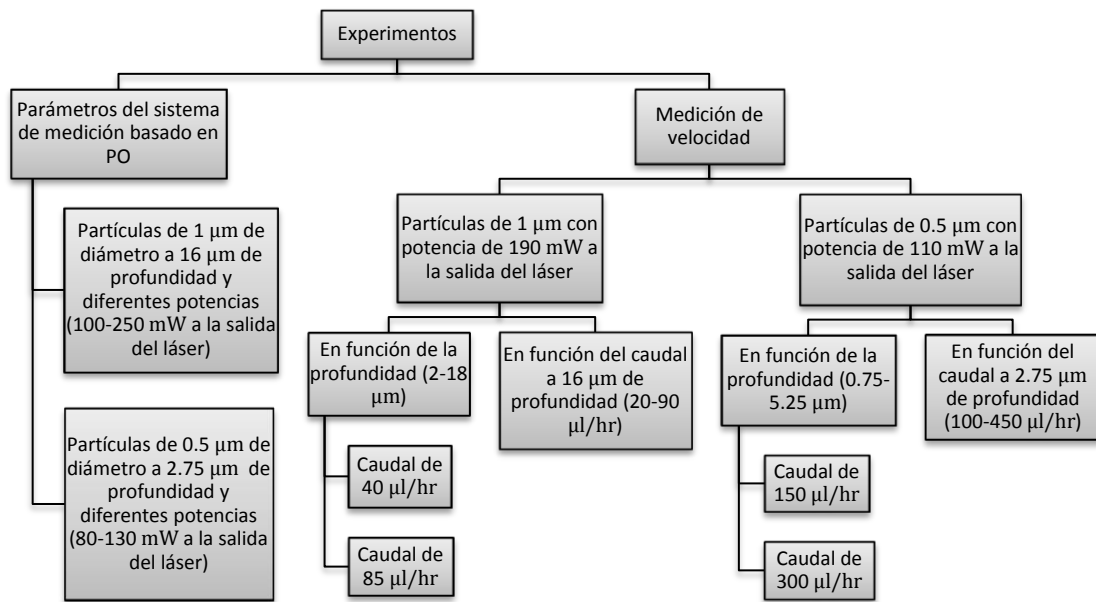


Figura 3.3 Esquema de la organización de los experimentos realizados.

Cada medición hecha en las cuatro series de experimentos en que se estudió la velocidad en función de la profundidad, independientemente del tamaño de la partícula usada, se realizó bajo la siguiente metodología:

1. Se verificó que la posición del microcanal fuera tal que el atrapamiento se llevara a cabo aproximadamente en el centro de éste con respecto a las direcciones  $x$  y  $y$ , y que la potencia a la salida del láser fuera la requerida según el esquema de la Figura 3.3.
2. Con ayuda de los tornillos micrométricos de la estación de traslación, se ajustó manualmente la posición del microcanal en dirección  $z$  de tal manera que una partícula atrapada previamente se mantuviera apenas tocando la pared interior del cubreobjetos. Lo anterior se logró observando en el osciloscopio la señal  $z$  generada por el FDC ([Apéndice B](#)): típicamente esta señal sufre un cambio abrupto apenas la partícula atrapada toca la pared del microcanal.

3. Se configuró el lector del sensor de posición LSP-z para que se considerara a la posición alcanzada en el Punto 2 como el origen. Con el canal en esta posición se ajustó el controlador del actuador piezoeléctrico CAP-z para que trabajara en lazo cerrado y con ello se pudieran generar movimientos con resolución de 5 nm. Después se manipuló ese mismo controlador para que la PO se situara en la profundidad a la que se pretendía realizar la medición.
4. Teniendo una partícula atrapada a la profundidad adecuada para la medición, se hizo oscilar el canal en dirección  $x$  a cuatro diferentes frecuencias (0.45 Hz, 0.66 Hz, 1 Hz y 1.35 Hz aproximadamente) con una amplitud aproximada de 8  $\mu\text{m}$ . Las oscilaciones fueron triangulares y con ellas se buscó inducir un flujo relativo a la partícula atrapada cuya velocidad aumentara al aumentar la frecuencia de oscilación toda vez que la amplitud se mantuvo constante. Lo anterior se logró utilizando el puerto de señal externa del controlador del actuador piezoeléctrico CAP-z y el generador de funciones GF. Para cada una de las cuatro frecuencias de oscilación se grabó un video de la partícula atrapada (10 segundos de grabación a una tasa de 500 cuadros por segundo) y, aproximadamente al mismo tiempo, se guardaron las tres señales generadas por el FDC (10 segundos de grabación a una frecuencia de muestreo de 10 kHz), lo anterior fue con la intención de obtener datos que pudieran llevar a la determinación del factor de calibración del FDC por medio del método de arrastre descrito en el [Apartado 2.3.2](#).
5. Se modificó la configuración del generador de funciones para que las oscilaciones del canal tuvieran forma sinusoidal, una amplitud de 130 nm y una frecuencia de 32 Hz. Bajo esta situación se atraparon tres diferentes partículas y se grabaron las señales generadas por el FDC al estar atrapada cada una de ellas. Lo anterior fue con la intención de obtener datos que pudieran llevar a la determinación del factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006) ([Apartado 2.3.3](#)). La grabación de las señales se hizo a una tasa de 50 kHz durante un periodo de 20 s.
6. Se interrumpieron las oscilaciones del canal y se atraparon (individualmente) cuatro diferentes partículas, grabándose las señales generadas por el FDC así como un video al estar atrapada cada una de ellas. La grabación de las señales del FDC se hizo a una tasa de 50 kHz durante un periodo de 20 s. La grabación de los videos se hizo a una tasa de 500 Hz durante un periodo de 20 s. Con la información proporcionada por el FDC sería posible obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC utilizando el método reportado por Berg-Sørensen *et al.* (2004) ([Apartado 2.3.3](#)) así como el método basado en filtros digitales ([Apartado 2.3.3](#)). Con la información proporcionada por los videos se podría obtener la constante de rigidez de la PO utilizando el teorema de equipartición ([Apartado 2.3.1](#)). Además, las señales del FDC y los videos obtenidos en este Punto podrían servir para determinar la posición promedio de una partícula atrapada en ausencia de flujo, correspondiente a la posición del centro del potencial.
7. Se indujo al interior del canal un flujo con el caudal requerido según el esquema de la Figura 3.3, lo anterior se hizo con ayuda de la bomba de infusión BI. Bajo esta situación se atraparon tres diferentes partículas, grabándose al mismo tiempo las

señales generadas por el FDC (20 segundos de grabación a una tasa de muestreo de 50 kHz) y un video de cada partícula al estar atrapada (20 segundos de grabación a una tasa de 277.821 cuadros por segundo). Con la información obtenida en este punto se podría determinar el desplazamiento de la posición promedio de la partícula respecto a la posición del centro del potencial, y con ésta, la velocidad del flujo en el punto de atrapamiento (Apartado 2.2.1). Además, durante la grabación de cada video, se obstaculizó brevemente la llegada del haz láser al objetivo de atrapamiento para contar con información que permitiera la determinación de la velocidad del flujo al hacer velocimetría por seguimiento de partículas sobre la partícula liberada (Sección 1.4).

Para el caso de los experimentos de medición de velocidad a una misma profundidad pero con diferentes caudales, se siguió la metodología descrita en los puntos anteriores, sólo que no se consideró necesario reajustar el origen en dirección  $z$  cada que se midió la velocidad correspondiente a un nuevo caudal. En el caso de los experimentos con los que se obtuvieron los parámetros del sistema de medición basado en PO en función de la potencia del láser a una misma profundidad, se siguió la metodología descrita en los puntos anteriores, pero no se consideró necesario reajustar el origen en dirección  $z$  cada que se modificó la potencia. Tampoco se siguieron los Puntos 4 y 5, correspondientes a la grabación de información para obtener el factor de calibración del FDC por medio de los métodos de arrastre (Apartado 2.3.2) y de Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006) (Apartado 2.3.3), ni el Punto 7 correspondiente a la inducción de flujo. De esta manera la información grabada en estos experimentos sirvió únicamente para obtener los parámetros de la PO con el método reportado por Berg-Sørensen *et al.* (2004) (Apartado 2.3.2), el método basado en filtros digitales (Apartado 2.3.2) y el método de equipartición (Apartado 2.3.1). El esquema de la Figura 4 muestra gráficamente los métodos con los que fue posible determinar tanto la velocidad como los parámetros de la PO al seguir la metodología descrita en esta Sección.

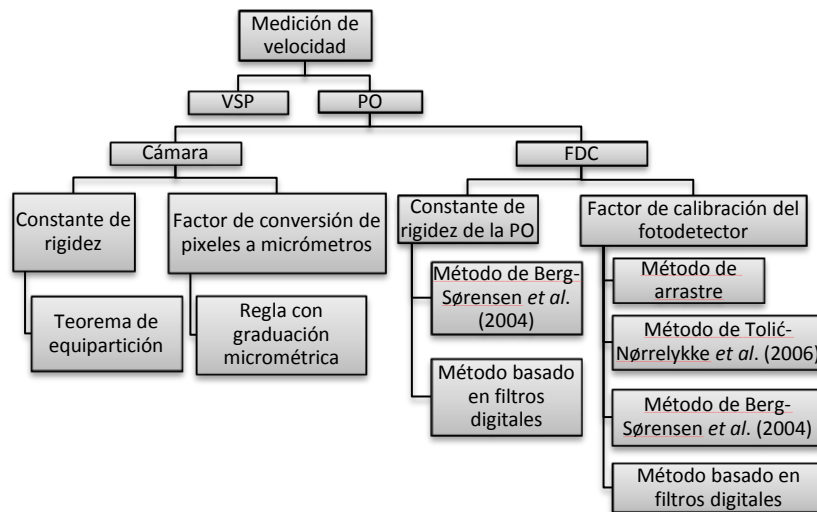


Figura 3.4 Métodos de medición de velocidad y determinación de parámetros de la PO.

## 3.3 Procesamiento de datos experimentales

### 3.3.1 Obtención de $k$ mediante el teorema de equipartición

Los videos obtenidos en el Punto 6 de la metodología expuesta en la [Sección 3.2](#) fueron procesados con la finalidad de obtener la constante de rigidez de la PO a través del teorema de equipartición ([Apartado 2.3.1](#)). Dicho procesamiento comenzó con la extracción de cada uno de los cuadros que componen a cada video con la ayuda del programa Virtual Dub, seguida de la conversión a escala de grises de cada imagen extraída y la optimización del contraste de cada una de dichas imágenes, las dos últimas por medio de una macro ejecutada en el programa Image J. Las imágenes con contraste optimizado fueron procesadas posteriormente con un programa basado en el algoritmo descrito por Grier para la ubicación de centroides de partículas dentro de una imagen (Crocker y Grier 1996). Este último programa proporcionó, por cada imagen procesada, un archivo de texto con una lista de la ubicación en pixeles de cada uno de los centroides de las partículas encontradas. Por último, el conjunto de archivos de texto generados al procesar todas las imágenes extraídas de un video fueron analizados con un programa de Matlab que reconstruyó la trayectoria seguida por cada una de las partículas encontradas con el programa basado en el algoritmo de Grier (Santana-Solano *et al.* 2005) y calculó la varianza de posición de la partícula atrapada a partir de la que se pudo obtener la constante de rigidez de la PO ([Apartado 2.3.1](#)). Las trayectorias mencionadas fueron pasadas de pixeles a micras a través de un factor de conversión obtenido con la ayuda de una regla con graduación micrométrica (R1L3S2P de Edmund Optics).

### 3.3.2 Obtención de $k$ y $\beta$ con el método propuesto por Berg-Sørensen y colaboradores

Las señales del FDC grabadas en el Punto 6 de la metodología expuesta en la [Sección 3.2](#) fueron procesadas con la finalidad de obtener tanto la constante de rigidez de la PO como el factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004) ([Apartado 2.3.3](#)) utilizando un programa desarrollado en Matlab por ese mismo equipo de investigación (Tolić-Nørrelykke *et al.* 2004). Las Figuras 3.5 y 3.6 muestran la interfaz del programa mencionado. Por medio de dicha interfaz fue posible habilitar, deshabilitar o ajustar las diferentes consideraciones o parámetros en los que se basa el ajuste de los datos experimentales.

a)



b)



Figura 3.5 Interfaz del programa desarrollado por Tolić-Nørrelykke *et al.* 2004 para obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004). a) y b) muestran las consideraciones habilitadas y el valor de los parámetros de ajuste que se utilizaron para obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC transversales y axiales, respectivamente, al atrapar partículas de 1  $\mu\text{m}$ .

Las Figuras 3.5a y 3.5b muestran las consideraciones habilitadas y el valor de los parámetros de ajuste que se utilizaron para obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC en dirección transversal y axial, respectivamente, al atrapar partículas de 1  $\mu\text{m}$ . Las Figuras 3.6a y 3.6b muestran las consideraciones habilitadas y el valor de los parámetros de ajuste que se utilizaron para obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC en dirección transversal y axial, respectivamente, al atrapar partículas de 0.5  $\mu\text{m}$ .

a)

b)

Figura 3.6 Interfaz del programa desarrollado por Tolić-Nørrelykke *et al.* 2004 para obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004). a) y b) muestran las consideraciones habilitadas y el valor de los parámetros de ajuste que se utilizaron para obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC transversales y axiales, respectivamente, al atrapar partículas de  $0.5 \mu\text{m}$ .

De forma típica se habilitaron las opciones de eliminación del *cross-talk*, de corrección del coeficiente de fricción en función de la frecuencia y de corrección por fenómeno de alias, mientras que se deshabilitaron las correcciones por el uso de filtros y por la respuesta del FDC. Las corrección por uso de filtros fue deshabilitada toda vez que el ajuste se obtuvo a partir de frecuencias pequeñas comparadas con la frecuencia de corte del filtro antialias utilizado (Apéndice C), situación bajo la que dichas correcciones no juegan un papel relevante (Berg-Sørensen *et al.* 2004). La corrección por la respuesta del FDC se deshabilitó debido a que no es necesaria para la longitud de onda del láser

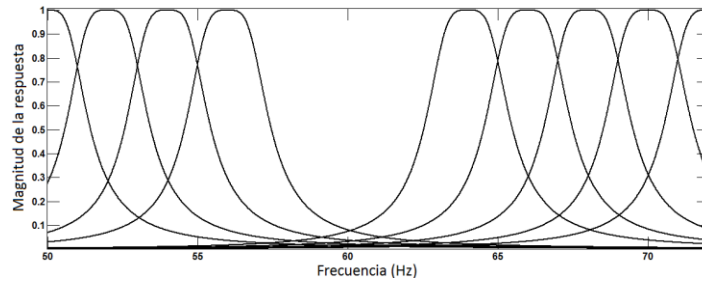
utilizado, pues para una longitud de onda de 532 nm el FDC no se comporta como un filtro “pasa bajas” (Berg-Sorensen *et al.* 2003). El límite inferior del rango de ajuste se procuró lo más grande posible sin que rebasara un valor igual a la mitad de la frecuencia de corte, esto ayudó a eliminar la contribución de las componentes de ruido mecánico en el ajuste (Berg-Sørensen *et al.* 2004). El número de frecuencias discretas sucesivas utilizadas en el promedio involucrado al realizar el *blocking* fue, en todos los casos, de 350. El ajuste de los datos experimentales hecho con este programa de Matlab proporcionó la frecuencia de corte en Hertz y el coeficiente de difusión en unidades arbitrarias (ya sea 1/s o V<sup>2</sup>/s dependiendo de si las señales del FDC están o no normalizadas), parámetros con los que fue posible obtener la constante de rigidez de la PO y el factor de calibración del FDC, respectivamente (Apartado 2.3.3).

### 3.3.3 Obtención de $k$ y $\beta$ mediante el método basado en filtros digitales

Las señales del FDC grabadas en el Punto 6 de la metodología expuesta en la Sección 3.2 fueron procesadas con la finalidad de obtener tanto la constante de rigidez de la PO como el factor de calibración del FDC por medio del método basado en filtros digitales (Apartado 2.3.3). Se procuró que el procesamiento de datos por medio del método basado en filtros digitales fuera equivalente al procesamiento basado en el método de Berg-Sørensen *et al.* (2004). De esta manera, el filtro utilizado para los datos provenientes del atrapamiento de partículas de 1  $\mu\text{m}$  se sintonizó a frecuencias entre 50 Hz y 2000 Hz para obtener las propiedades de la PO en dirección transversal y entre 10 Hz y 2000 Hz para obtener dichas propiedades en dirección axial. Así mismo, para los datos provenientes del atrapamiento de partículas de 0.5  $\mu\text{m}$  el filtro utilizado se sintonizó a frecuencias entre 300 Hz y 3000 Hz para obtener las propiedades de la PO en dirección transversal y entre 100 Hz y 3000 Hz para obtenerlas en dirección axial. La Tabla 3.1 contiene otras características de los filtros utilizados en las diferentes situaciones. La Figura 3.7 muestra la magnitud de la respuesta de los filtros a la frecuencia así como el espaciado entre frecuencias de sintonización contiguas para el caso de la obtención de las propiedades de la PO en dirección transversal a partir de datos provenientes del atrapamiento de partículas de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro.

	Rango de sintonización (propiedades transversales)	Rango de sintonización (propiedades axiales)	$h_e$ (propiedades transversales)	$h_e$ (propiedades axiales)	$h_e T_m$ (propiedades transversales)	$h_e T_m$ (propiedades axiales)
Partículas de 1 $\mu\text{m}$	50-2000 Hz	10-2000 Hz	5.0951 Hz	0.5677 Hz	101.902	11.354
Partículas de 0.5 $\mu\text{m}$	300-3000 Hz	100-3000 Hz	11.1736 Hz	11.0708 Hz	223.472	221.416

Tabla 3.1 Características principales de los filtros digitales usados para obtener las propiedades de la PO en cada dirección al trabajar con los dos diferentes tamaños de partículas usados.  $h_e$  es el ancho de banda equivalente del filtro y  $h_e T_m$  es una medida de la cantidad de frecuencias discretas comprendidas dentro del ancho de banda equivalente del filtro (ver Apartado 2.3.3).



**Figura 3.7 Magnitud de la respuesta de los filtros a la frecuencia para el procesamiento de datos provenientes del atrapamiento de partículas de 1  $\mu\text{m}$ . En esta figura se puede apreciar el espaciamiento típico entre frecuencias de sintonización contiguas.**

La metodología de procesamiento fue la siguiente: el archivo entregado por el osciloscopio, el cual contiene las señales generadas por el FDC al estar una partícula atrapada, se procesó con un programa de Matlab que filtró cada señal con un filtro digital sintonizado sobre un rango de frecuencias según la Tabla 3.1 y cuyas características obedecieron a esa misma Tabla, obteniéndose de dicho programa un archivo con la varianza de cada señal filtrada para cada una de las frecuencias de sintonización; los datos contenidos en dicho archivo fueron ajustados a una Lorentziana auxiliándose del programa Origin, dejando a la frecuencia de corte como uno de los parámetros de ajuste y obteniéndose a partir de ella el valor de la constante de rigidez de la PO en cada dirección ([Apartado 2.3.3](#)); a partir de la varianza asociada a las constantes de rigidez de la PO en las diferentes direcciones y de la varianza de las señales provenientes de la integración de las curvas obtenidas de los ajustes mencionados, se obtuvo el factor de calibración del FDC ([Apartado 2.3.3](#)).

### 3.3.4 Obtención de $\beta$ mediante el método de arrastre

Los videos y las señales del FDC grabados en el Punto 4 de la metodología expuesta en la [Sección 3.2](#) fueron procesados con la finalidad de obtener el factor de calibración del FDC por medio del método de arrastre ([Apartado 2.3.2](#)). Del procesamiento de los videos se pudo obtener la trayectoria de la partícula atrapada (Figura 3.8a) siguiendo para ello el mismo procedimiento mencionado en el [Apartado 3.3.1](#). Por otro lado las señales generadas por el FDC proporcionaron directamente la respuesta del FDC para cada desplazamiento de la partícula atrapada (Figura 3.8b). El ejemplo de la Figura 3.8 es equivalente al ejemplo de la Figura 2.5 del [Apartado 2.3.2](#). Existe un desfase de la señal en la Figura 3.8a respecto a las Figuras 3.8b y 3.8c que es un desfase en los tiempos de grabación y no uno entre el movimiento de la partícula respecto al de la muestra. De hecho para la situación crítica en que la muestra osciló a 1.35 Hz (velocidad de la muestra de 54  $\mu\text{m/s}$ ) el tiempo en que una partícula permaneció fija en una posición de equilibrio antes de cambiar a la otra (0.37 s independientemente del movimiento Browniano) fue alrededor de doscientas veces más grande que el tiempo necesario para realizar la transición de posición (1.85 ms para un desplazamiento de 0.1  $\mu\text{m}$ ).

Con la ayuda de un filtro, cuya función es promediar los valores abarcados por su longitud, y cuya longitud fue igual al número de cuadros, o datos, grabados por la cámara, o el osciloscopio, en la mitad de un periodo de oscilación fue posible obtener el valor del desplazamiento promedio de la partícula debido al arrastre del fluido así como el valor del



cambio promedio en la señal generada por el FDC debido al desplazamiento de la partícula. Ajustando a una línea recta el cociente de las dos cantidades anteriores para las cuatro frecuencias de oscilación marcadas en la metodología mencionada en la [Sección 3.2](#) se obtuvo el factor de calibración del FDC ([Apartado 2.3.2](#)). En la Figura 3.9 se muestra un ejemplo equivalente al de la Figura 2.6 del [Apartado 2.3.2](#): se observa el comportamiento del desplazamiento promedio de la partícula atrapada como función del cambio promedio en la señal del FDC para una partícula de  $1\ \mu\text{m}$  atrapada a una profundidad de  $16\ \mu\text{m}$ .

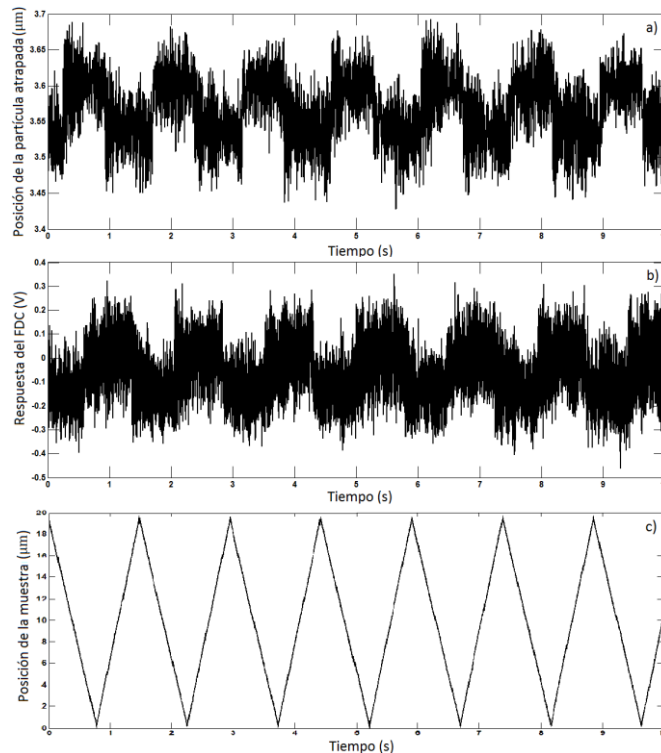


Figura 3.8 Posición de la partícula atrapada al hacer oscilar la muestra. La trayectoria a) se obtuvo por medio del procesamiento de video mientras que b) es la señal generada por el FDC. En este ejemplo la muestra osciló a  $0.68\ \text{Hz}$  (c) mientras que una partícula de  $1\ \mu\text{m}$  de diámetro se mantuvo atrapada a  $16\ \mu\text{m}$  de profundidad. Existe un desfase de a) respecto a b) y c) que es un desfase en los tiempos de grabación y no del movimiento de la partícula respecto al de la muestra.

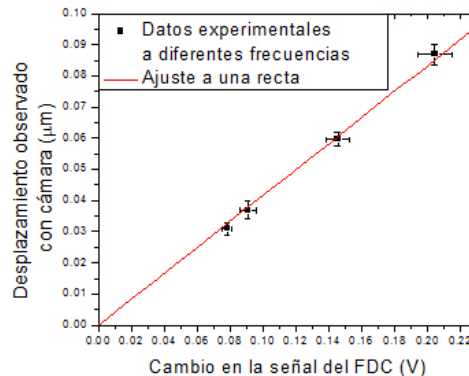


Figura 3.9 Comportamiento del desplazamiento promedio de una partícula de  $1\ \mu\text{m}$  atrapada a una profundidad de  $16\ \mu\text{m}$  como función del cambio promedio en la señal del FDC para frecuencias de oscilación de la muestra de entre  $0.45$  y  $1.35\ \text{Hz}$  (velocidades de entre  $17$  y  $51\ \mu\text{m/s}$ ), aproximadamente.

### 3.3.5 Obtención de $\beta$ con el método propuesto por Tolić-Nørrelykke y colaboradores

Las señales del FDC grabadas en el Punto 5 de la metodología expuesta en la [Sección 3.2](#) fueron procesadas con la finalidad de obtener el factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006) ([Apartado 2.3.3](#)). Para dicho procesamiento se utilizó el mismo programa de Matlab mencionado en el [Apartado 3.3.2](#). Teniendo en cuenta que lo que se busca en este caso es el valor de la densidad espectral de potencia (DEP) a la frecuencia de oscilación de la muestra dictada por la metodología de la [Sección 3.2](#), el número de frecuencias discretas consecutivas a partir del que se realizó el *blocking* necesario para el ajuste de éstas fue 1 (Figura 3.10), independientemente del tamaño de la partícula atrapada con que se produjeron las señales procesadas. A partir de dicho valor de la DEP se obtuvo el factor de calibración del FDC ([Apartado 2.3.3](#)). Las demás consideraciones y parámetros de ajuste disponibles no juegan un papel relevante y pueden ser cuales quiera



Figura 3.10 Consideraciones habilitadas y valor de los parámetros de ajuste utilizados típicamente para la obtención del factor de calibración del FDC por medio del método propuesto por Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006). El único parámetro relevante fue el número de frecuencias discretas consecutivas a partir del que se realizó el *blocking*, éste fue de 1 con la intención de obtener el valor de la DEP justo a la frecuencia de oscilación de la muestra.

### 3.3.6 Medición de velocidad

Con el procesamiento de los videos grabados en el Punto 7 de la metodología expuesta en la [Sección 3.2](#) se logró medir el desplazamiento de la posición promedio debido al arrastre del flujo de las partículas que fueron atrapadas. A través de este desplazamiento se pudo obtener la velocidad del flujo alrededor de dichas partículas al modelar a la PO como un resorte ([Apartado 2.2.1](#)) y usando cámara como medio de observación. El procesamiento de estos videos fue el mismo que el necesario para obtener la constante de rigidez de la PO por medio del teorema de equipartición ([Apartado 3.3.1](#)). Por otro lado, obteniendo el promedio de las señales del FDC grabadas también en el Punto 7 de la metodología expuesta en la [Sección 3.2](#), se logró medir el desplazamiento de la posición promedio debido al arrastre del flujo de las partículas que fueron atrapadas, obteniendo así la

velocidad en la vecindad de dichas partículas pero usando ahora el FDC como medio de observación ([Apartado 2.2.1](#)).

Además, del seguimiento a las partículas liberadas de la PO durante la grabación de los video del Punto 7 de la metodología experimental seguida ([Sección 3.2](#)) se logró obtener una velocidad promedio débilmente influida por el movimiento Browniano toda vez que dicho promedio se realizó sobre una cantidad significativa de mediciones de velocidad entre cuadros de video consecutivos (típicamente entre 25 y 100 mediciones para el caso de partículas de 0.5  $\mu\text{m}$  y entre 37 y 313 para el caso de partículas de 1  $\mu\text{m}$ ), lo que implicó dar seguimiento a tal partícula a lo largo de poco más de 9  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.7 Cálculo de velocidad teórica

Además de su determinación experimental, ya sea por medio de PO o mediante micro-VSP, la velocidad del flujo inducido en el microcanal a determinada profundidad pudo ser estimada de forma teórica para las condiciones de flujo procuradas. Dicha estimación teórica es relevante pues representa una referencia independiente más con la cual comparar las mediciones experimentales de velocidad hechas con PO.

La velocidad teórica esperada  $u$  para un determinado caudal  $Q$  y una profundidad  $z$  especificada se calculó en base a la Ecuación 3.1 que proviene de la solución de las ecuaciones de Navier-Stokes pertinentemente simplificadas para el caso de un flujo estacionario, incompresible y totalmente desarrollado, que se da entre dos placas planas semi-infinitas, toda vez que se procuró que estas condiciones fueran válidas para las dimensiones del microcanal utilizado ([Sección 3.1](#)) y la zona del canal donde se realizaron las mediciones ([Sección 3.2](#)).

$$u(Q, z) = 6 \frac{Qz}{At} \left(1 - \frac{z}{t}\right). \quad (3.1)$$

En la Ecuación 3.1,  $Q$  es el caudal suministrado por la bomba de infusión (que es determinado por ésta en base al diámetro interno de la jeringa utilizada),  $z$  es la profundidad del canal a la que se desea calcular la velocidad  $u$  del flujo,  $A$  es el área de la sección transversal del microcanal dada por el ancho y la profundidad total  $t$  de éste ([Sección 3.1](#)).

### 3.3.8 Propagación del error

La medición de velocidad por medio de PO se realizó por medio de tres parámetros determinados experimentalmente: la constante de rigidez de la PO, el factor de calibración del FDC y el desplazamiento de la posición promedio de una partícula atrapada debido a la fuerza de arrastre del fluido. Cada uno de esos parámetros fue determinado, con cierta variación dada por la desviación estándar de los datos experimentales, para cada una de las condiciones específicas en que se llevaron a cabo los experimentos (tamaño de partícula, profundidad de atrapamiento, caudal suministrado por la bomba y potencia de atrapamiento). La variación de los tres parámetros usados para determinar la velocidad fue considerada para calcular el error de esta última. La propagación del error se realizó considerando los efectos lineales de cada una de las fuentes de error consideradas, tratadas como variables aleatorias no correlacionadas (Box *et al.* 1993). De

acuerdo a lo anterior, la varianza de la velocidad fue obtenida con la contribución de las siguientes tres fuentes de error (Ecuación 3.2): las variaciones en constante de rigidez, factor de calibración del FDC y desplazamiento de la posición promedio de la partícula atrapada. Cada término en la suma de la Ecuación 3.2 correspondió a la multiplicación del cuadrado de la pendiente  $\theta$ , que representa la alteración en el valor de velocidad al variar la fuente de error correspondiente alrededor de su valor promedio, por la varianza de dicha fuente (Box *et al.* 1993).

$$V \cong \theta_1^2 \sigma_1^2 + \theta_2^2 \sigma_2^2 + \theta_3^2 \sigma_3^2. \quad (3.2)$$

En la Ecuación 3.2,  $V$  es la varianza en velocidad debido a las tres fuentes de error consideradas;  $\theta_1$ ,  $\theta_2$  y  $\theta_3$  son, respectivamente, las pendientes del cambio producido en la velocidad al variar la constante de rigidez, el factor de calibración del FDC y el desplazamiento de la posición promedio de la partícula atrapada alrededor de sus valores promedio;  $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$  y  $\sigma_3$  son, respectivamente, las desviaciones estándar que presentan cada una de las fuentes de error. El error en la determinación de velocidad se tomó como la raíz cuadrada de la varianza obtenida con la Ecuación 3.2.

En cuanto al error en las velocidades obtenidas por medio de micro-VSP, éste se obtuvo por medio de la Ecuación 1.9. En cuanto al error en el cálculo de la velocidad teórica, éste consideró únicamente la incertidumbre en las mediciones de la profundidad total del canal pues no se contó con información del fabricante que permitiera tomar en cuenta las variaciones de flujo inherentes a la bomba.

La metodología expuesta en este apartado fue la empleada para obtener las barras de error que se muestran en las figuras presentadas en el capítulo de resultados.

Hasta aquí se han presentado las metodologías de experimentación y de procesamiento de datos seguidas con el objetivo de realizar mediciones de velocidad utilizando una PO y de comparar dichas mediciones con las obtenidas por medio de micro-VSP. En el [capítulo](#) siguiente se presentan y discuten los resultados obtenidos al seguir dichas metodologías.

# Capítulo 4: Determinación del perfil de velocidad al interior de un microcanal

## 4.1 Parámetros de la pinza óptica en función de la potencia a profundidad constante

La determinación de los parámetros de una pinza óptica (PO) como función de la potencia del láser constituye una forma sencilla de evaluar el sistema, pues con ella puede apreciarse si su comportamiento corresponde al esperado. El parámetro más relevante de una PO es su constante de rigidez pues su valor proporciona una medida de la fuerza con que se atrapa una partícula. Se espera que dicha constante tenga un comportamiento lineal respecto a la potencia. La Figura 4.1 muestra el comportamiento observado en la constante de rigidez de la PO en cada dirección (véase la Figura 3.2 sobre la orientación del microcanal) en función de la potencia a la salida del láser<sup>1</sup> para partículas de 1  $\mu\text{m}$ , mientras que en la Figura 4.2 se muestra lo mismo pero para partículas de 0.5  $\mu\text{m}$ .

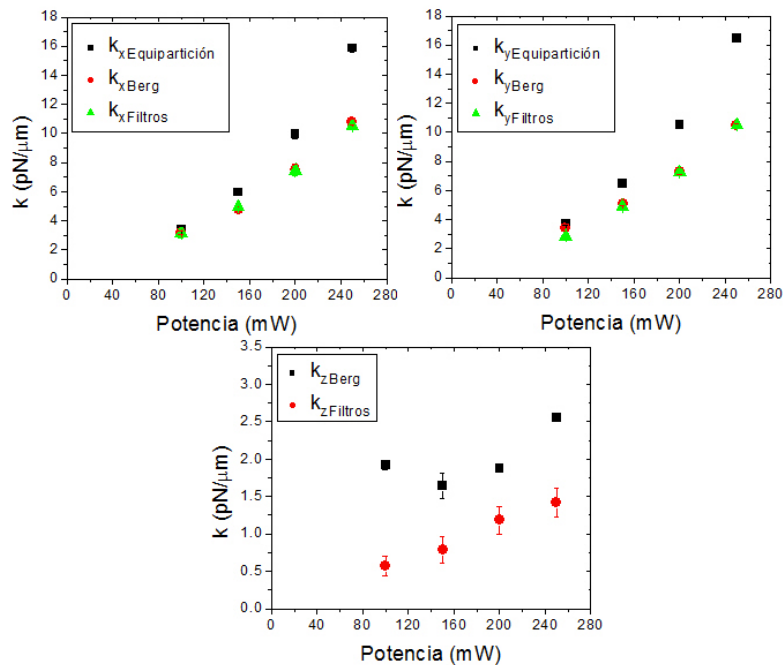


Figura 4.1 Constante de rigidez de la PO en cada dirección en función de la potencia a la salida del láser. Dicha constante fue obtenida por medio del teorema de equipartición, usando cámara, y los métodos de Berg-Sørensen *et al.* (2004) y de filtros digitales, usando FDC. La profundidad de atrapamiento fue de 16  $\mu\text{m}$  y el diámetro de la partícula atrapada fue de 1  $\mu\text{m}$ .

<sup>1</sup> Esta potencia se ve disminuida en un 90% por el filtro neutro colocado a la salida del láser. La potencia restante disminuye alrededor de 80% al pasar el haz a través de los demás componentes ópticos (Andersson *et al.* 2011). La potencia indicada en las figuras de este capítulo no toma en cuenta tales disminuciones.

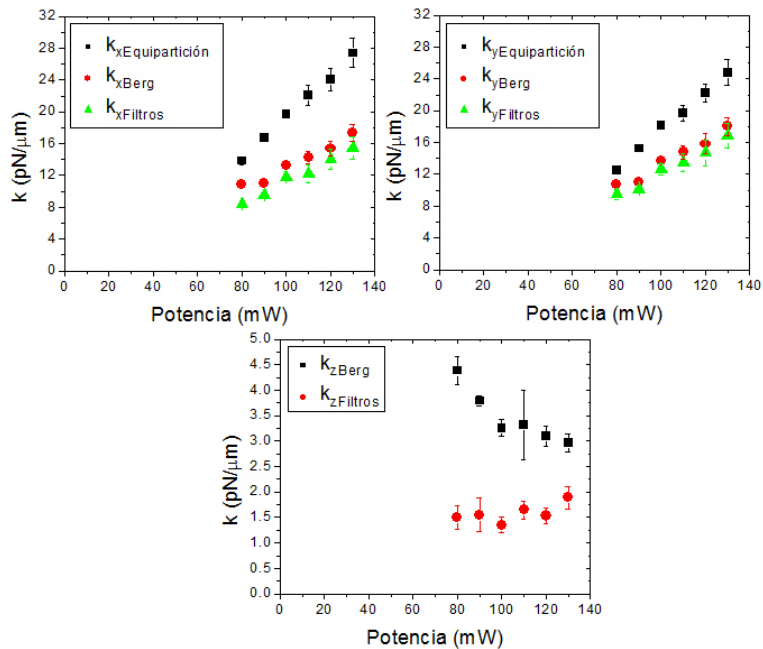


Figura 4.2 Constante de rigidez de la PO en cada dirección en función de la potencia a la salida del láser. Dicha constante fue obtenida por medio del teorema de equipartición, usando cámara, y los métodos de Berg-Sørensen *et al.* (2004) y de filtros digitales, usando FDC. La profundidad de atrapamiento fue de  $2.75 \mu\text{m}$  y el diámetro de la partícula atrapada fue de  $0.5 \mu\text{m}$ .

La constante de rigidez de la PO en dirección  $x$  (véase la Figura 3.2 sobre la orientación del microcanal) fue considerada como la más relevante dadas las características del flujo bajo el que se realizaron las mediciones de velocidad, ya que la velocidad medida tendría una sola componente en dirección  $x$ . Sin embargo, en las Figuras 4.1 y 4.2 se muestra el comportamiento de las constantes de rigidez en direcciones  $y$  y  $z$  para evidenciar el potencial que tiene el sistema para realizar mediciones de tres componentes de velocidad.

En la Figura 4.1 se observa cómo el comportamiento de la constante de rigidez de la PO obtenida con los diferentes métodos para las partículas de  $1 \mu\text{m}$  de diámetro resultó ser aproximadamente lineal. Sin embargo, se aprecia una diferencia promedio de 20% entre las constantes de rigidez en direcciones  $x$  y  $y$  obtenidas con el fotodetector de cuadrante (FDC) como medio de observación (métodos de Berg-Sørensen *et al.* (2004) y de filtros digitales) en comparación con las obtenidas con cámara (método de equipartición). En la Figura 4.2 se observa también un comportamiento lineal de la constante de rigidez de la PO para el caso de partículas con diámetro de  $0.5 \mu\text{m}$ . Sin embargo, en este caso se tuvo una diferencia promedio de 37% entre las constantes de rigidez en direcciones  $x$  y  $y$  obtenidas con el FDC como método de observación en comparación con las obtenidas con cámara. Una característica notable de las diferencias mencionadas fue que se mostraron consistentes no solo en los experimentos hechos variando la potencia, sino que también en todos los experimentos en los que se varió la profundidad se obtuvieron constantes de rigidez más pequeñas al usar FDC como medio de observación. Los métodos usados para procesar la información obtenida con FDC están basados en la densidad espectral de potencia (DEP) de las señales generadas por el FDC (Apartados 3.3.2 y 3.3.3), mientras que el método usado para procesar la información

obtenida con cámara se basa en el teorema de equipartición (Apartado 3.3.1). Eom *et al.* (2014) reportan diferencias entre las constantes de rigidez obtenidas con el método de equipartición y un método basado en la DEP, resultando siempre mayores (40% en promedio) las obtenidas con el primer método, en concordancia con lo observado por nosotros.

En cuanto a la constante de rigidez de la PO en dirección  $z$ , los valores que este parámetro mostró fueron bastante más pequeños que los valores obtenidos para la constante de rigidez de la PO en las otras direcciones, lo anterior coincide con lo esperado dado que los gradientes de intensidad en dirección axial típicamente son mucho menores que en las direcciones transversales (Li 2011; Rohrbach 2005). Por otro lado, no se observó una tendencia clara de la constante de rigidez en dirección  $z$  a pesar de que es de esperarse una tendencia como la observada para las constantes en las direcciones  $x$  y  $y$ .

Otro de los parámetros del sistema de medición basado en PO es el valor del factor de calibración del FDC. Se espera que el factor de calibración en las direcciones  $x$  y  $y$  no cambie a pesar de modificar la potencia de atrapamiento puesto que las señales provenientes del FDC, que proporcionan información de la posición transversal de la partícula atrapada, se encuentran normalizadas con respecto a la señal que proporciona información de la posición de la partícula en dirección  $z$ , que es la señal con mayor magnitud enviada por el FDC. Por otro lado se espera que el factor de calibración en dirección  $z$  disminuya, es decir, que la sensibilidad del sistema incrementa, conforme la potencia de atrapamiento aumenta toda vez que la magnitud de dicha señal es mayor al ser proporcional a la intensidad de luz que llega al área activa del FDC. La Figuras 4.3 y 4.4 muestran como el comportamiento del factor de calibración del FDC en función de la potencia coincidió con el esperado para los dos tamaños de partícula utilizados.

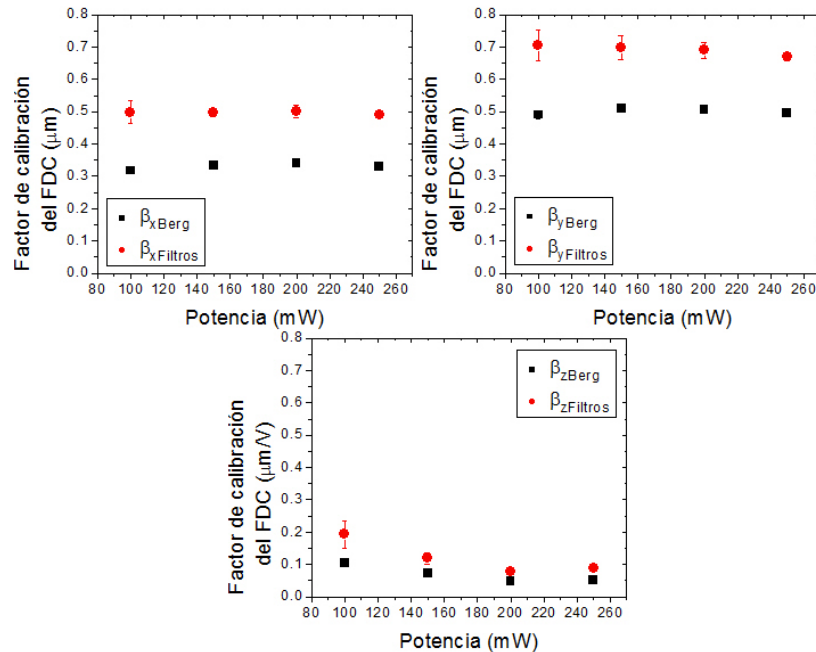


Figura 4.3 Factor de calibración del FDC en cada dirección obtenido con el método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004) y con el método basado en filtros digitales en función de la potencia a la salida del láser para una partícula de  $1 \mu\text{m}$  de diámetro atrapada a  $16 \mu\text{m}$  de profundidad.

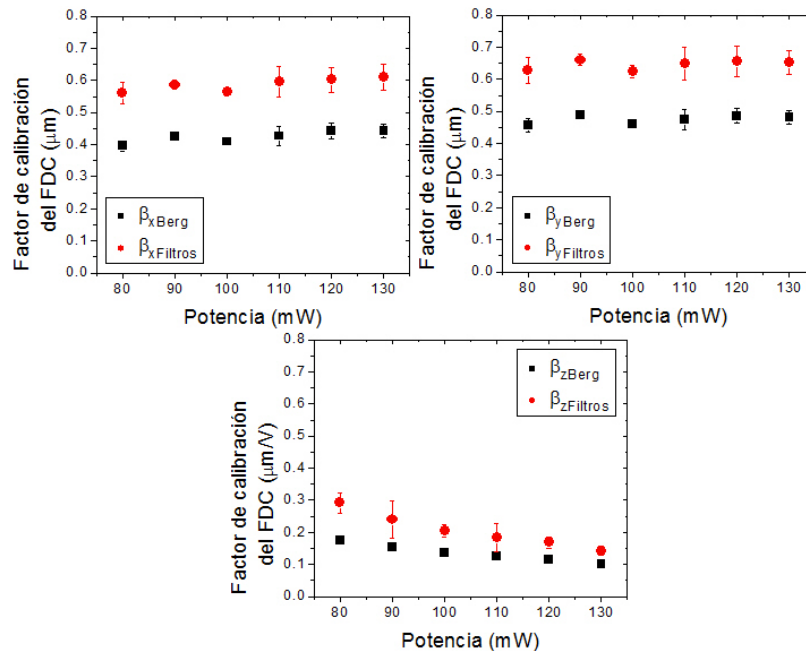


Figura 4.4 Factor de calibración del FDC en cada dirección obtenido con el método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004) y con el método basado en filtros digitales en función de la potencia a la salida del láser para una partícula de  $0.5 \mu\text{m}$  de diámetro atrapada a  $2.75 \mu\text{m}$  de profundidad.

## 4.2 Medición de velocidad en función de la profundidad

Los experimentos de medición de velocidad a diferentes profundidades permitieron conocer antes que nada el comportamiento de los parámetros necesarios para realizar las mediciones de velocidad con el sistema basado en PO (constante de rigidez y factor de calibración del FDC) en función de la profundidad.

En cuanto al factor de calibración del FDC, éste pudo ser obtenido en dirección  $x$  con cuatro diferentes métodos: el reportado por Berg-Sørensen *et al.* (2004), el método basado en filtros digitales, el método de arrastre y el método propuesto por Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006) (Sección 3.3). En las direcciones  $y$  y  $z$  el factor de calibración del FDC sólo se obtuvo con el método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004) y el basado en filtros digitales. Lo anterior se muestra en la Figura 4.5, para el caso de partículas de  $1 \mu\text{m}$  de diámetro. Debe mencionarse que las profundidades de atrapamiento indicadas en la Figura 4.5, y siguientes en donde se haga referencia a la profundidad, no se encuentran corregidas para tomar en cuenta el fenómeno conocido en inglés como *focal shift*: al mover en dirección axial la muestra donde se realiza el atrapamiento una distancia conocida, la posición axial del punto de atrapamiento no se desplazará una distancia igual a la distancia que se movió la muestra. Lo anterior es causado por la diferencia entre el índice de refracción del cubreobjetos (vidrio) y el del medio en donde se lleva a cabo el atrapamiento (agua). Para un haz débilmente enfocado, la diferencia entre el cambio de posición de la muestra y el desplazamiento del punto de enfoque del haz (*focal shift*) puede ser calculada mediante la ley de Snell. Sin embargo, para un haz altamente enfocado el *focal shift* sigue un comportamiento no lineal y para ser determinado debe recurrirse a técnicas experimentales basadas en el análisis de los patrones de interferencia



o difracción observados con cámara de video o en la observación del comportamiento del coeficiente de arrastre de la partícula atrapada, ambos en función de la profundidad (Neuman y Block 2004). No tomar en cuenta el *focal shift* en la determinación de la profundidad produce un error en el cálculo del coeficiente de arrastre de la partícula atrapada. Sin embargo, como se aprecia en las Ecuaciones 2.3 y 2.16, el coeficiente de arrastre no influye en la determinación de velocidad usando PO cuando los parámetros de ésta son calculados mediante los métodos basados en la DEP. Debido a lo anterior, y a la dificultad para implementar las técnicas experimentales con las que se determina, no se tomó en cuenta el fenómeno de *focal shift* en ninguno de los resultados mostrados en este trabajo.

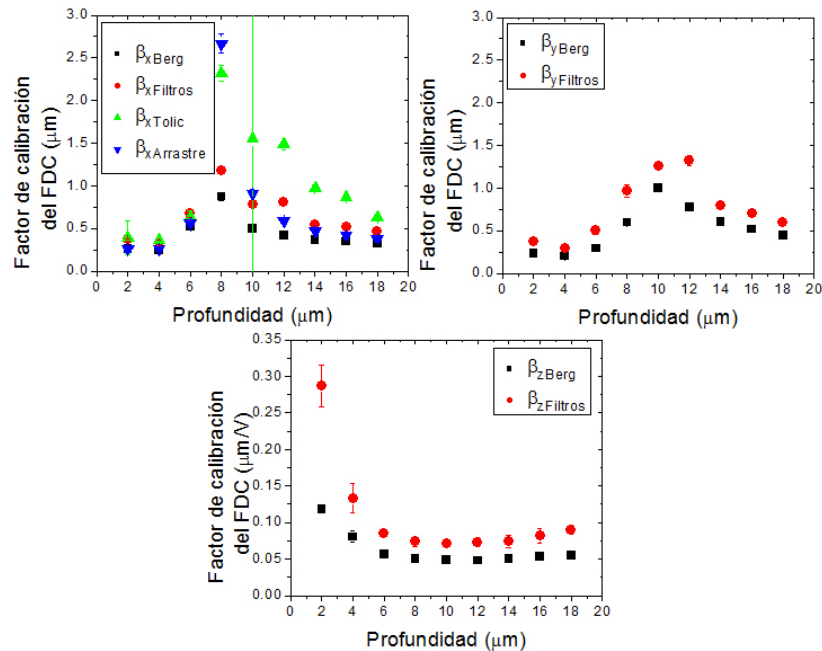


Figura 4.5 Factor de calibración del FDC en cada dirección como función de la profundidad para una partícula de 1  $\mu\text{m}$ . En la dirección  $x$  se utilizaron el método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004), el método basado en filtros digitales, el método de Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006) y el método de arrastre, mientras que en las otras direcciones se usaron solo los dos primeros métodos mencionados. La potencia a la salida del láser fue de 190 mW.

En la Figura 4.5 se observa una fuerte dependencia del factor de calibración del FDC en direcciones  $x$  y  $y$  para el caso de partículas de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. De hecho, se observa lo que parece ser una discontinuidad alrededor de los 8  $\mu\text{m}$  de profundidad, teniéndose en esa zona una gran disminución de la sensibilidad del sistema en comparación con la observada en puntos alejados de ésta. Las considerables diferencias encontradas entre las velocidades medidas con FDC y las obtenidas mediante micro-velocimetría por seguimiento de partículas (micro-VSP) a profundidades cercanas a los 8  $\mu\text{m}$  al emplearse partículas de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (diferencias que se mostrarán más adelante) tienen una clara correlación con la disminución de la sensibilidad del sistema en la zona mencionada.

Cabe mencionar que al observar con FDC la distribución de posición en dirección  $x$  de partículas de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro atrapadas en la zona cercana a los 8  $\mu\text{m}$  de profundidad, dicha distribución no resultó gaussiana como se esperaba (Figura 4.6). Sin embargo, al observar con cámara, dicha distribución sí correspondió a una gaussiana

(Figuras 4.7). Esto corroboró que el potencial de atrapamiento creado a profundidades cercanas a los 8  $\mu\text{m}$  era cuadrático aunque no se observara como tal por medio del FDC. Lo anterior descartó posibles puntos de metaestabilidad que modificarían la forma del potencial creado, evidenciando un problema con el sistema de detección en el plano focal posterior (DPFP) más que con el adecuado atrapamiento. La disminución de sensibilidad del sistema en la zona mencionada tiene una clara correlación con la distribución de posición no gaussiana observada en ella con el FDC.

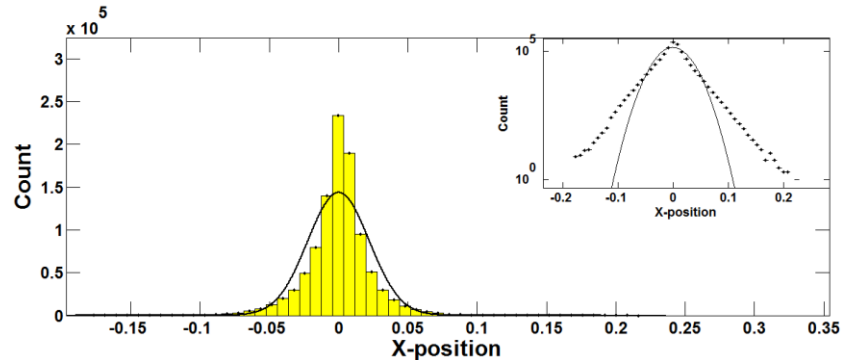


Figura 4.6 Distribución de posición de una partícula de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro atrapada a 8  $\mu\text{m}$  de profundidad al ser observada con FDC, ajustada a una curva gaussiana. En el inserto se muestra la misma distribución en escala logarítmica y ajustada a una parábola. El eje horizontal es adimensional al provenir de las señales del FDC antes de obtener el factor de calibración de éste.

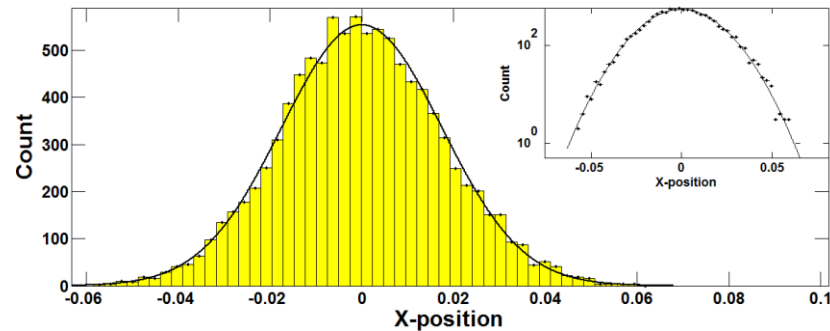


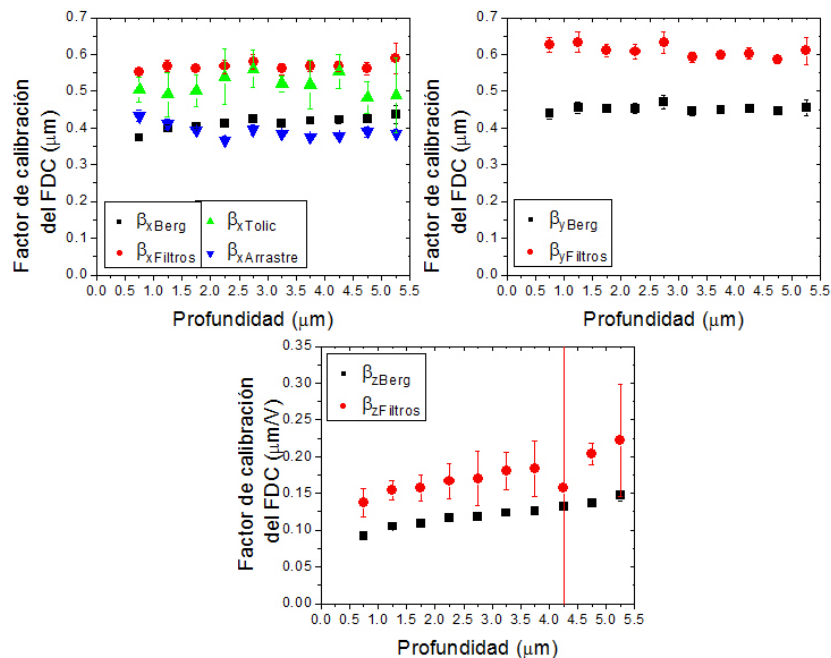
Figura 4.7 Distribución de posición de una partícula de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, atrapada a 8  $\mu\text{m}$  de profundidad al ser observada con cámara, ajustada a una curva gaussiana. En el inserto se muestra la misma distribución en escala logarítmica y ajustada a una parábola. El eje horizontal se encuentra en micrómetros.

Se creyó que la observación con FDC de una distribución no gaussiana pudo deberse a alguna de las siguientes razones: 1) un problema no resuelto en la alineación del sistema de DPFP, aunque debe decirse que ésta se verificó reiteradamente con la intención de tener un mejoramiento en la distribución de posición observada con el FDC; 2) la utilización de un objetivo de microscopio de baja apertura numérica ( $A.N.=0.4$ ) como condensador, toda vez que esto impide captar la totalidad de la luz proveniente del objetivo de atrapamiento, perdiéndose una gran cantidad de información del fenómeno lo que está relacionado con una baja sensibilidad en el sistema de DPFP (Rohrbach *et al.* 2003; Samadi y Reihani 2011); 3) algún fenómeno relacionado con el tamaño de la partícula respecto con la longitud de onda del láser de atrapamiento, pues el método de DPFP se basa en los patrones de interferencia formados en el plano focal posterior del condensador que surgen de la interacción entre la luz esparcida y no esparcida por la partícula (Allersma *et al.* 1998); o 4) un perfil de intensidad (modo) no exactamente

gaussiano en el haz láser de atrapamiento. Las dos primeras posibles causas fueron descartadas posteriormente a la realización de los experimentos que se reportan en esta sección, al estudiar el comportamiento del factor de calibración del FDC en función de la profundidad con un nuevo arreglo experimental que incluyó un condensador con alta apertura numérica (Sección 4.4). Las últimas dos posibles causas no pudieron ser estudiadas por los alcances del presente trabajo.

En la Figura 4.8 se muestra el comportamiento del factor de calibración del FDC en las tres direcciones como función de la profundidad para partículas de  $0.5 \mu\text{m}$ . A diferencia de lo observado para partículas de  $1 \mu\text{m}$ , con partículas de  $0.5 \mu\text{m}$  el factor de calibración del FDC tiene una débil dependencia de la profundidad. Además, con partículas de  $0.5 \mu\text{m}$  no se observaron diferencias en la forma de las distribuciones de posición observadas con cámara y FDC. En la Figura 4.8 también se puede observar cómo es que, a pesar de tener una tendencia similar, los factores de calibración obtenidos con los distintos métodos presentaron valores considerablemente diferentes.

Es difícil saber cuál de los métodos utilizados es el que proporciona el factor de calibración correcto, es por ello que las mediciones de velocidad que se presentan en este trabajo fueron obtenidas considerando como factor de calibración del FDC al promedio de los obtenidos con el método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004) y el método basado en filtros digitales (Sección 3.3), que son los métodos más simples en cuanto a su implementación experimental y su procesamiento.



**Figura 4.8** Factor de calibración del FDC en cada dirección como función de la profundidad para una partícula de  $0.5 \mu\text{m}$ . En la dirección  $x$  se utilizaron el método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004), el método basado en filtros digitales, el método de Tolić-Nørrelykke *et al.* (2006) y el método de arrastre, mientras que en las otras direcciones se usaron sólo los dos primeros métodos. La potencia a la salida del láser fue de  $110 \text{ mW}$ .

En cuanto a la constante de rigidez de la PO, ésta pudo ser obtenida en direcciones  $x$  y  $y$  por medio del teorema de equipartición, el método propuesto por Berg-Sørensen *et*

al. (2004) y el método basado en filtros digitales (Sección 3.3), mientras que en dirección  $z$  sólo se obtuvo con los dos últimos métodos mencionados. Lo anterior se muestra en las Figuras 4.9, para el caso de partículas de  $1\ \mu\text{m}$  de diámetro, y 4.10, para el caso de partículas de  $0.5\ \mu\text{m}$  de diámetro.

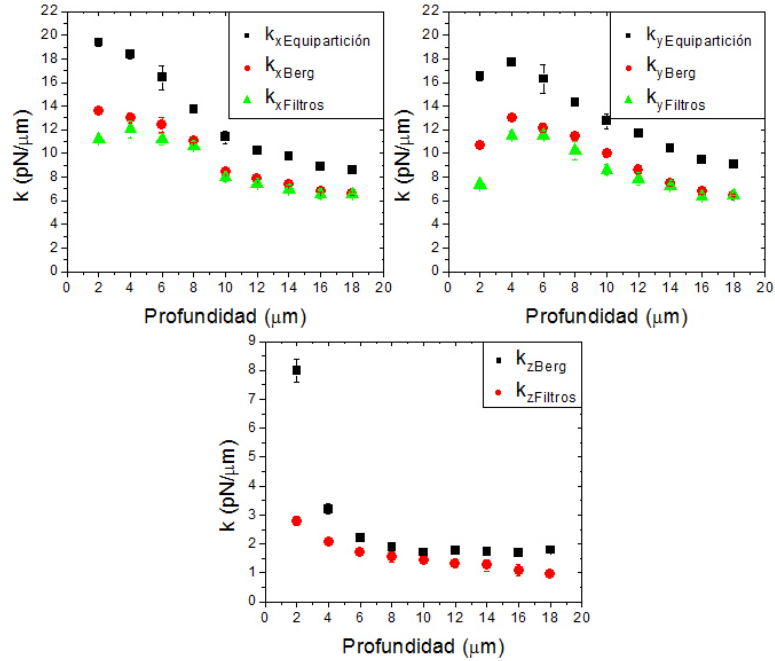


Figura 4.9 Constante de rigidez de la PO en cada dirección como función de la profundidad para una partícula de  $1\ \mu\text{m}$ . En la direcciones  $x$  y  $y$  se utilizaron el método de equipartición, el método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004) y el método basado en filtros digitales, mientras que en dirección  $z$  se usaron sólo los dos primeros métodos. La potencia a la salida del láser fue de  $190\ \text{mW}$ .

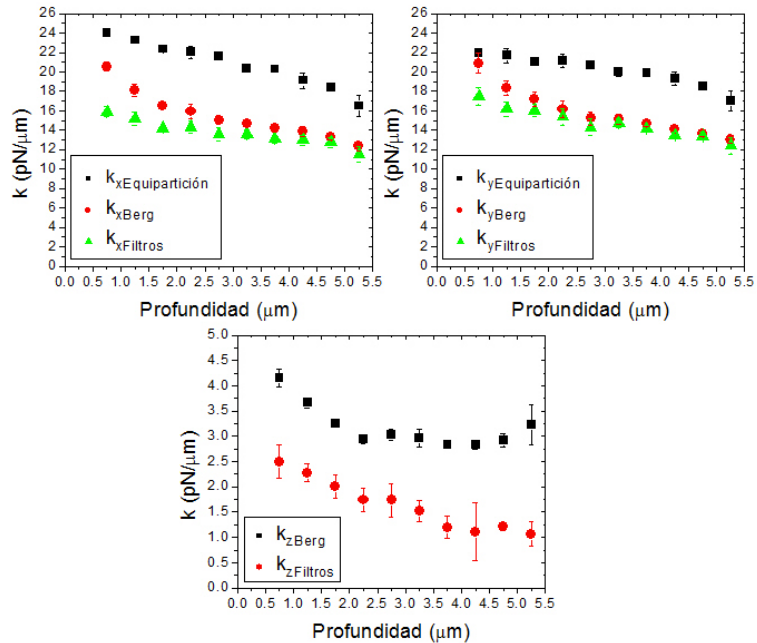


Figura 4.10 Constante de rigidez de la PO en cada dirección como función de la profundidad para una partícula de  $0.5\ \mu\text{m}$ . En la direcciones  $x$  y  $y$  se utilizaron el método de equipartición, el método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004) y el método basado en filtros digitales, mientras que en dirección  $z$  se usaron sólo los dos primeros métodos mencionados. La potencia a la salida del láser fue de  $110\ \text{mW}$ .

En las Figuras 4.9 y 4.10 se observa un decremento de la constante de rigidez de la pinza con el aumento de la profundidad para los dos tamaños de partícula utilizados. Este comportamiento concuerda con el esperado debido a las aberraciones causadas al utilizar como objetivo de atrapamiento uno de inmersión en aceite (Vermeulen 2006). Por otro lado, se muestra consistente la diferencia entre los valores de constante de rigidez obtenidos con la cámara a través del teorema de equipartición y los obtenidos con FDC a través de los métodos basados en la DEP: las constantes de rigidez obtenidas con teorema de equipartición son siempre mayores. La razón de lo anterior no está clara, sin embargo, como se puede observar en la Figura 4.11, las velocidades obtenidas al usar FDC coincidieron de mejor manera con las obtenidas por micro-VSP en comparación con las velocidades calculadas con la constante de rigidez obtenida mediante el teorema de equipartición al utilizar cámara, lo anterior independientemente del tamaño de la partícula empleada. Para los cálculos de velocidad con FDC como medio de observación se utilizó el promedio de las constantes de rigidez provenientes del método de Berg-Sørensen *et al.* (2004) y el método basado en filtros digitales correspondientes a cada profundidad de atrapamiento. Las velocidades obtenidas mediante micro-VSP se tomaron como referencia toda vez que con esta técnica se mide de manera casi directa la velocidad del fluido siempre que se tenga la precaución de procurar que la influencia del movimiento Browniano en las mediciones sea despreciable, como de hecho se hizo para generar los resultados presentados en este trabajo ([Apartado 3.3.6](#)). La línea continua en cada una de las gráficas de la Figura 4.11 representa la velocidad teórica esperada a una determinada profundidad y caudal. Existen diferencias entre la línea de velocidad teórica y las mediciones obtenidas mediante los otros métodos, pero ambas (velocidades teóricas y experimentales) se mantienen siempre en el mismo orden, a pesar de que los valores de velocidad calculados teóricamente dependen en gran medida de una medición precisa del canal y del caudal real que se está suministrando. De hecho se puede intuir que al menos uno de los parámetros con los que se determinó la velocidad teórica ([Apartado 3.3.7](#)) fue medido de forma imprecisa pues la línea continua en las gráficas de la Figura 4.11 se mantiene siempre por debajo de la velocidad obtenida mediante micro-VSP, que, como se dijo, constituye una medición casi directa de la velocidad del fluido.

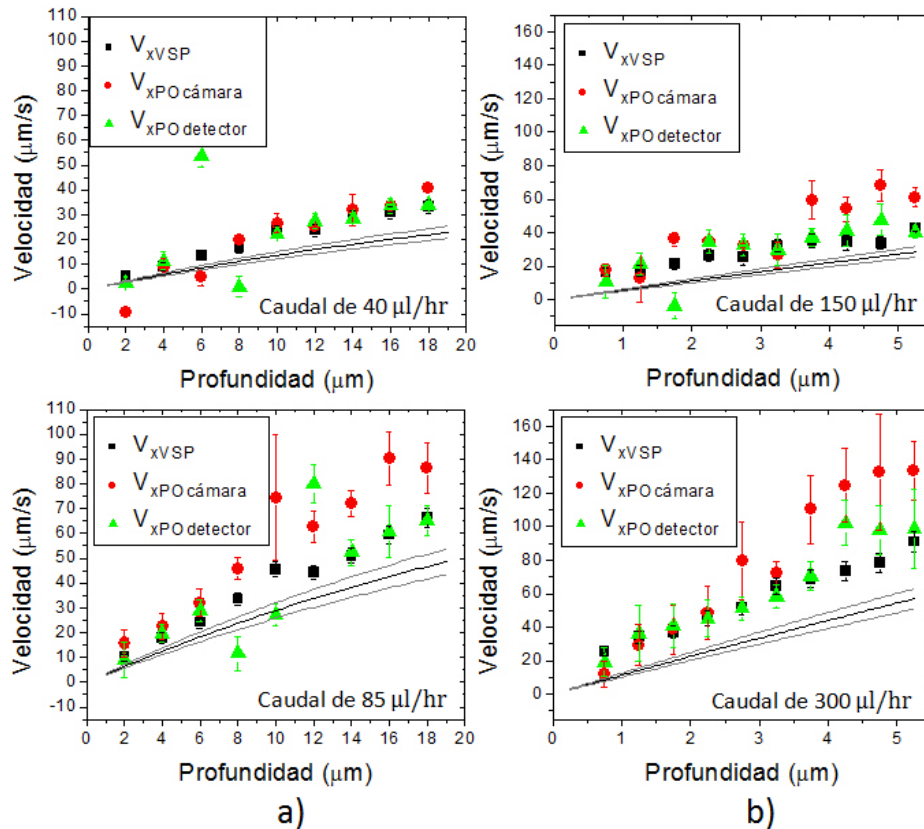


Figura 4.11 Velocidad como función de la profundidad a diferentes caudales usando a) partículas de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y b) de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las velocidades se obtuvieron por medio de micro-VSP, PO con cámara como medio de observación y PO con FDC como medio de observación. La línea negra continua representa la velocidad teórica esperada para el caudal suministrado por la bomba, mientras que las líneas grises representan su error.

En la Figura 4.11a se puede observar que los valores de velocidad obtenidos con FDC como medio de observación presentaron una diferencia considerable con respecto a los obtenidos con micro-VSP en la zona cercana a los 8  $\mu\text{m}$  de profundidad. Debe notarse que es precisamente en esta zona en donde al trabajar con partículas de 1  $\mu\text{m}$  se tiene una disminución considerable de la sensibilidad del sistema así como una distribución de posición de la partícula atrapada aparentemente no gaussiana cuando ésta se observa con FDC.

El porcentaje de diferencia entre los valores obtenidos con micro-VSP y los obtenidos mediante PO con FDC fuera de la zona mencionada fue de 16% en promedio para el flujo de 40  $\mu\text{l/hr}$ , mientras que para el flujo de 85  $\mu\text{l/hr}$  fue de 8% en promedio. El porcentaje de diferencia entre las velocidades obtenidas con micro-VSP y las obtenidas con PO con FDC, en el caso de partículas de 0.5  $\mu\text{m}$ , fue de 31% en promedio para el flujo de 150  $\mu\text{l/hr}$ , mientras que para el flujo de 300  $\mu\text{l/hr}$  fue de 13% en promedio.

A pesar de que las diferencias con respecto al método de micro-VSP pueden considerarse significativas, debe tomarse en cuenta el orden de las magnitudes medidas. En el caso de partículas de 1  $\mu\text{m}$ , las mediciones de velocidad involucraron mediciones de desplazamientos de la posición promedio de la partícula de entre 7 nm y 75 nm, correspondientes a fuerzas de arrastre entre 90 fN y 500 fN. En el caso de partículas de

0.5  $\mu\text{m}$ , las mediciones de velocidad involucraron mediciones de desplazamientos de la posición promedio de la partícula con rango de 5 nm a 34 nm, correspondientes a fuerzas de arrastre de entre 80 fN y 415 fN. Tanto para las partículas de 1  $\mu\text{m}$  como para las de 2  $\mu\text{m}$  el ancho de banda al que las fuerzas mencionadas fueron medidas fue de 0.05 Hz. Es decir, para medirlas fue necesario realizar un promedio sobre un tiempo de 20 s, lo que hace de las PO una herramienta de medición de velocidad bajo condiciones estacionarias.

Las gráficas de la Figura 4.11 demuestran la habilidad de las PO para medir velocidad con resolución dada por el tamaño de la partícula atrapada sin una influencia significativa del movimiento Browniano. Esto representa una importante característica pues la resolución obtenida con una PO es intrínseca al tamaño de la partícula utilizada y para obtenerla no es necesario realizar un tratamiento especial dependiendo de la resolución que se pretenda alcanzar. En el caso de las técnicas de micro-VSP y microvelocimetría por imágenes de partículas (micro-VIP) es necesario utilizar procesamientos especiales para lograr resoluciones espaciales de un par de micrómetros (Capítulo 8 de Raffel *et al.* (2013)). Además, con dichas técnicas debe recurrirse al procesamiento de imágenes con un costo computacional mucho mayor al necesario para procesar las señales provenientes del FDC. También debe tenerse en cuenta que para lograr resoluciones de un par de micrómetros con micro-VSP o micro-VIP es necesario utilizar grandes concentraciones de partículas, mientras que al trabajar con PO las concentraciones pueden ser tan bajas como se quiera mientras no disminuya demasiado la probabilidad de que alguna partícula pase cerca de la trampa para realizar con ella la medición.

Debe recordarse que para las mediciones hechas en este trabajo mediante micro-VSP no se utilizaron grandes concentraciones de partículas y aun así se logró minimizar la influencia del movimiento Browniano, sin embargo, ello involucró dar seguimiento a una partícula suspendida en el flujo a través de una distancia de poco más de 9  $\mu\text{m}$  (Apartado 3.3.6), obteniéndose una resolución espacial muy burda comparada con la resolución nanométrica obtenida con PO al emplear partículas de 0.5  $\mu\text{m}$ .

### **4.3 Medición de velocidad en función del caudal a profundidad constante**

Los resultados de los experimentos de medición de velocidad a una misma profundidad pero diferentes caudales se muestran en la Figura 4.12, donde se aprecia que la diferencia entre las velocidades obtenidas con PO, utilizando cámara como medio de observación, y las obtenidas con micro-VSP fue casi siempre mayor que la diferencia entre las velocidades obtenidas con esta última técnica y las que se obtuvieron con PO usando FDC como medio de observación. El porcentaje de diferencia entre estas dos últimas fue de 12.6% en promedio para el caso de la partícula de 1  $\mu\text{m}$ , mientras que para la partícula de 0.5  $\mu\text{m}$  fue de 19.8%. Nuevamente debe tenerse en cuenta el orden de las magnitudes medidas. En el caso de partículas de 1  $\mu\text{m}$  las mediciones de velocidad involucraron mediciones de desplazamientos de la posición promedio de la partícula con rango de 20 nm a 65 nm, correspondientes a fuerzas de arrastre de entre 140 fN y 450 fN. En el caso de partículas de 0.5  $\mu\text{m}$  las mediciones de velocidad involucraron mediciones de desplazamientos de la posición promedio de la partícula de entre 4 nm y 22 nm,



correspondientes a fuerzas de arrastre de entre 56 fN y 307 fN. Como se mencionó antes, las fuerzas ejercidas sobre la partícula fueron medidas con un ancho de banda de 0.05 Hz.

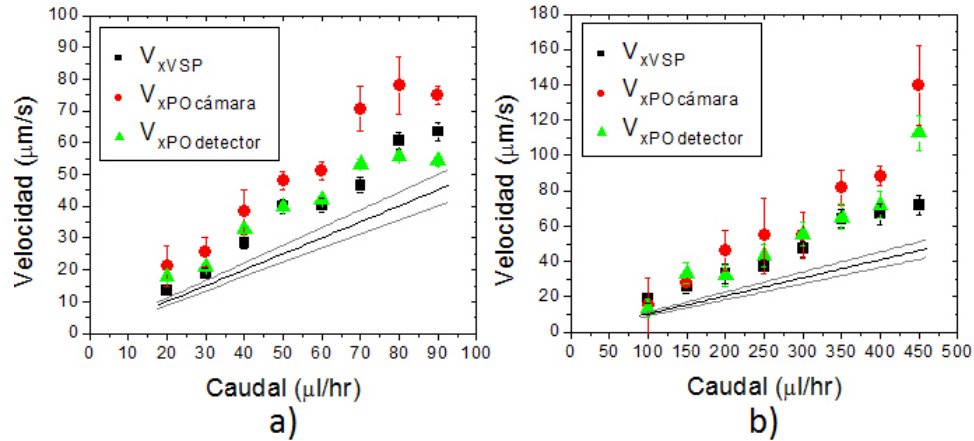


Figura 4.12 Velocidad como función del caudal usando a) partículas de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y b) de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las velocidades se obtuvieron por medio de micro-VSP, PO con cámara como medio de observación y PO con FDC como medio de observación. La línea continua representa la velocidad teórica esperada para el caudal suministrado por la bomba, mientras que las líneas grises representan su error. La profundidad de atrapamiento fue de 16  $\mu\text{m}$  y 2.75  $\mu\text{m}$  para el caso de partículas de 1  $\mu\text{m}$  y 0.5  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

#### 4.4 Comportamiento de $\beta$ en función de la profundidad con nuevo arreglo experimental

Para descartar o corroborar la influencia de la apertura numérica del objetivo usado como condensador en la disminución drástica de la sensibilidad del sistema de DPFP que se observó al trabajar con partículas de 1  $\mu\text{m}$ , se modificó el arreglo experimental reportado en la Sección 3.1, reemplazando el objetivo de microscopio de 20x (apertura numérica de 0.4) por un condensador con apertura numérica de 1.4 (ON-14 de Lomo). Además, para descartar o corroborar la influencia de la alineación del arreglo experimental en la disminución en la sensibilidad del sistema, el arreglo experimental fue modificado para que el atrapamiento se diera con el haz propagándose en dirección vertical (dirección perpendicular a la mesa de trabajo; PO vertical), a diferencia del arreglo reportado en la Sección 3.1 en el que el atrapamiento se efectuó con el haz propagándose en dirección horizontal (PO horizontal).

Con las modificaciones mencionadas, se estudió el comportamiento del factor de calibración del FDC en función de la profundidad para partículas de 1  $\mu\text{m}$  de acuerdo al método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004), siguiendo una metodología similar a la descrita en la Sección 3.2 para el método de Berg-Sørensen *et al.* (2004). La Figura 4.13 muestra los resultados de este estudio y en ésta se puede observar que  $\beta$  se comportó cualitativamente igual que antes de modificar el arreglo experimental (Figura 4.5), de tal forma que continuó existiendo una zona de abrupta disminución de sensibilidad del sistema de DPFP localizada a la misma profundidad.



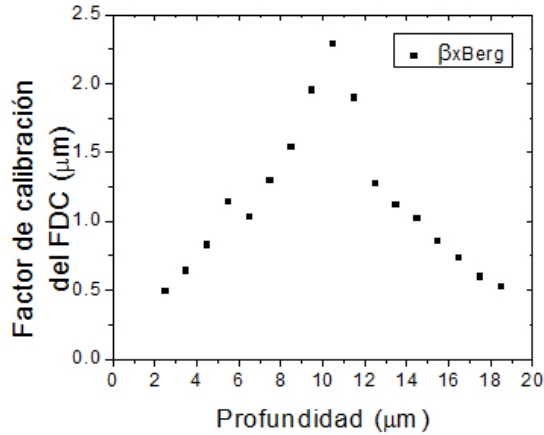


Figura 4.13 Comportamiento del factor de calibración del FDC en función de la profundidad después de utilizar un condensador con apertura numérica de 1.4 y modificar el arreglo experimental para tener una PO vertical. La potencia a la salida del láser para este estudio fue de 190 mW.

Además, en dicha zona en la que  $\beta$  se ve disminuida se siguió observando con el FDC una distribución de posición de la partícula atrapada aparentemente no gaussiana (Figura 4.14). Lo anterior descartó la posibilidad de que la baja apertura numérica del objetivo de microscopio usado como condensador o una deficiente alineación del sistema hayan producido la zona de disminución abrupta de sensibilidad que se observó en los experimentos de medición de velocidad reportados en las secciones anteriores de este capítulo.

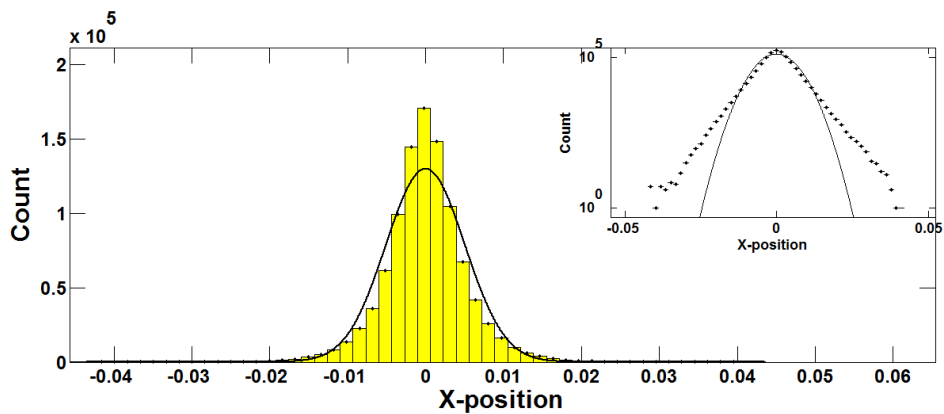


Figura 4.14 Distribución de posición de una partícula de 1  $\mu\text{m}$  atrapada a 10.5  $\mu\text{m}$  de profundidad observada con FDC después de utilizar un condensador con apertura numérica de 1.4 y modificar el arreglo experimental para tener una PO vertical. La potencia a la salida del láser para este estudio fue de 190 mW. En el inserto se muestra la misma distribución en escala logarítmica y ajustada a una parábola. El eje horizontal es adimensional al provenir de las señales del FDC antes de obtener el factor de calibración de éste.

En seguida se realizó una modificación más al arreglo experimental: se manipuló la apertura del diafragma de iris DI1 (Figura 3.1) para que el haz láser expandido no sobrellebase la pupila de entrada del objetivo de microscopio de atrapamiento OM1 (Figura 3.1), sino que su diámetro fuera inferior al de dicha pupila (el diámetro del diafragma antes y después de ser manipulado fue de 4 y 20 mm, respectivamente). Con tal modificación al arreglo experimental, se estudió el comportamiento del factor de calibración del FDC en función de la profundidad para partículas de 1  $\mu\text{m}$  de acuerdo al

método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004), siguiendo una metodología similar a la descrita en la [Sección 3.2](#). La Figura 4.15 muestra los resultados de este estudio y en ella se puede observar que  $\beta$  dejó de tener el mismo comportamiento respecto a la profundidad que hasta antes de dicho estudio había sido observado (Figuras 4.5 y 4.13), de tal forma que dejó de existir una zona de abrupta disminución de sensibilidad del sistema de DPFP. Además, la distribución de posición de una partícula se observó gaussiana independientemente de la profundidad de atrapamiento y de que ésta fuera observada con cámara o con FDC (Figura 4.16). Por lo tanto, se descarta definitivamente la posibilidad de que la baja apertura numérica del condensador o una deficiente alineación del sistema hayan producido la zona de disminución de sensibilidad que se observó en los experimentos en las secciones anteriores de este capítulo. El estudio realizado permitió también remarcar la correlación existente entre la observación de una distribución de posición no gaussiana y una disminución abrupta en la sensibilidad del sistema de DPFP.

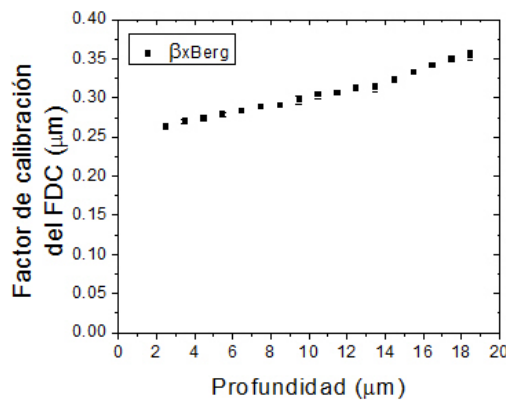


Figura 4.15 Comportamiento del factor de calibración del FDC en función de la profundidad después de modificar la apertura del iris anterior al objetivo de atrapamiento. La potencia a la salida del láser fue de 190 mW.

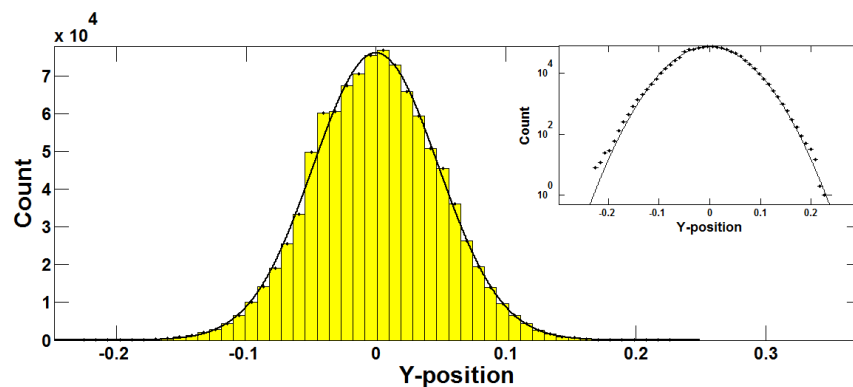
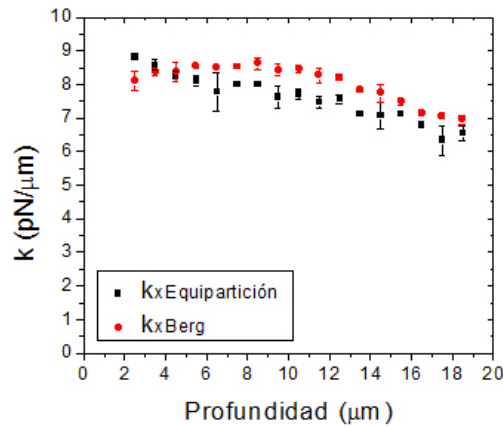


Figura 4.16 Distribución de posición de una partícula de 1  $\mu\text{m}$  atrapada a 10.5  $\mu\text{m}$  de profundidad observada con FDC después de modificar la apertura del iris anterior al objetivo de atrapamiento. La potencia a la salida del láser fue de 190 mW. En el inserto se muestra la misma distribución en escala logarítmica y ajustada a una parábola. El eje horizontal es adimensional al provenir de las señales del FDC antes de obtener el factor de calibración de éste.

Después de haber modificado la apertura del iris DI1, se realizaron experimentos para observar el comportamiento de la constante de rigidez de la PO como función de la profundidad para partículas de 1  $\mu\text{m}$ , por medio del teorema de equipartición (usando cámara de video), así como por medio del método propuesto por Berg-Sørensen *et al.* (2004) (usando FDC). Lo anterior se logró con una metodología similar a la explicada en la

**Sección 3.2.** Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 4.17 y en ella se aprecia una buena coincidencia entre los dos diferentes métodos empleados para la determinación de la constante de rigidez de la PO (7.5% de diferencia promedio entre las constantes obtenidas con cámara y las obtenidas con FDC), lo que significa una mejora significativa con respecto a las diferencias encontradas entre estos mismos métodos en los experimentos de medición de velocidad reportados en las secciones anteriores de este capítulo.



**Figura 4.17** Comportamiento de la constante de rigidez de la PO en función de la profundidad después de modificar la apertura del diafragma de iris anterior al objetivo de atrapamiento. La potencia a la salida del láser fue de 190 mW.

## 4.5 Trabajo a futuro

Se ha encontrado la manera de evitar una abrupta disminución en la sensibilidad del sistema y se han descartado dos de sus posibles causas, sin embargo no se cuenta con una explicación formal del fenómeno que la produce. Para llegar a dicha explicación es necesario estudiar las dos posibles causas de tal fenómeno que no han sido descartadas aún. Una es la posibilidad de que en la interacción misma entre el láser y la partícula, que puede verse modificada por la variación en la apertura del diafragma de iris anterior al objetivo de atrapamiento, se encuentre la explicación a la mencionada disminución en la sensibilidad. Para corroborar lo anterior es necesario el desarrollo de modelos que describan la interacción láser-partícula para diferentes condiciones de apertura del diafragma de iris. La otra posibilidad es que la disminución de sensibilidad se produzca por un perfil de intensidad (modo) no perfectamente gaussiano en el haz de atrapamiento, que cambia con el filtrado espacial involucrado al modificar la apertura del diafragma de iris. Para corroborar lo anterior es necesario realizar nuevos experimentos. Tanto el desarrollo de modelos como de nuevos experimentos queda fuera de los alcances de este trabajo, pero su realización en el futuro debe ser la pauta para mejorar la técnica de medición de velocidad basada en PO's.

# Conclusiones

En este trabajo se ha reportado la forma como se implementó y probó un sistema de medición de velocidad basado en una pinza óptica (PO) que utilizó dos diferentes medios de observación: cámara, por medio de videomicroscopía, y fotodetector de cuadrante (FDC), a través del método de detección en el plano focal posterior (DPFP). Los parámetros característicos del sistema de medición basado en PO y uso de FDC fueron obtenidos con diferentes métodos para dos tamaños de partículas. El comportamiento de dichos parámetros, tanto en función de la potencia como de la profundidad, resultó ser cualitativamente el mismo independientemente del método utilizado para obtenerlos.

El sistema de medición basado en PO fue comparado con uno basado en microvelocimetría por seguimiento de partículas (micro-VSP). Este último fue considerado como método de referencia puesto que es una manera casi directa de realizar las mediciones de velocidad y se procuró eliminar de él la influencia del movimiento Browniano. El sistema de medición basado en PO y uso de FDC como medio de observación mostró mejor concordancia con el método de referencia que el sistema también basado en PO pero con cámara como medio de observación.

El método basado en PO y uso de FDC, para el caso de partículas de  $1\ \mu\text{m}$ , presentó una región en la que las mediciones de velocidad realizadas tienen una diferencia considerable con las obtenidas mediante micro-VSP. Dicha región coincide con la región en la que la sensibilidad del sistema presenta una gran disminución. Fuera de esa región se observa una buena concordancia entre las dos técnicas.

Con observaciones experimentales fue posible descartar que la existencia de la región de baja sensibilidad mencionada haya sido causada por el uso de un condensador con baja apertura numérica o por una alineación deficiente del arreglo experimental. Así mismo, se encontró experimentalmente una forma de evitar la existencia de tal región.

El sistema basado en PO y uso de FDC, para el caso de partículas de  $0.5\ \mu\text{m}$ , mantiene prácticamente la misma sensibilidad independientemente de la profundidad, así como una buena concordancia con la técnica de referencia a lo largo de toda la región de atrapamiento.

Las mediciones de velocidad obtenidas mediante los diferentes métodos se compararon con un modelo teórico muy simple pero que mostró una estimación aceptable con fines ilustrativos. La falta de concordancia entre el modelo teórico y el método de referencia pudo ser causada por una medición inexacta de las dimensiones del canal pues las velocidades calculadas teóricamente se mantienen siempre por debajo de las obtenidas con micro-VSP, mostrando un error consistente.

Con este trabajo se ha demostrado la habilidad de la PO's para medir velocidad en ambientes micrométricos con resoluciones que prácticamente corresponden al tamaño de la partícula atrapada. Lo anterior es de suma relevancia toda vez que, como se ha reportado en este trabajo, puede trabajarse con partículas de tamaño nanométrico y alcanzar con ello resoluciones muy difíciles de obtener con otros métodos.

Este trabajo se ha enfocado en dar un uso a la PO's ligeramente diferente al que tradicionalmente se les ha dado en el campo de biofísica, por ejemplo. Sin embargo este enfoque está lejos de ser agotado y el potencial de las PO's como herramienta de medición de velocidad en microfluidos no ha sido aprovechado por completo. Sin embargo, para que se pueda tener un mejor aprovechamiento de dicho potencial es necesario realizar, entre otras cosas: el desarrollo de herramientas que permitan el uso adecuado de las PO's en el contexto específico de la medición de velocidad, por ejemplo, el desarrollo de sistemas de medición automáticos que proporcionen adicionalmente un diagnóstico que sugiera los rangos pertinentes de velocidad a medir bajo determinadas condiciones de la trampa; estudios que exploren la posibilidad de obtener tres componentes de velocidad; estudios que exploren la posibilidad de obtener de forma simultánea mediciones de velocidad y temperatura.

## Apéndice A: Fuerzas de atrapamiento en el régimen de Rayleigh

Cuando una partícula atrapada en una pinza óptica (PO) es pequeña comparada con la longitud de onda del láser de atrapamiento, esto es, el diámetro de la partícula es al menos cinco veces más pequeño que la longitud de onda del láser (Nieminen *et al.* 2010), las fuerzas que ejerce el potencial creado sobre dicha partícula pueden ser calculadas con la aproximación de Rayleigh: la partícula es vista como un dipolo eléctrico que interactúa con la luz láser vista como un campo eléctrico incidente. Dicha interacción produce dos tipos de fuerzas cuya suma corresponde a la fuerza total ejercida sobre la partícula atrapada: una fuerza debida a los gradientes de intensidad del haz de atrapamiento y otra debida al esparcimiento de luz de la partícula (Harada y Asakura 1996). En su trabajo, Harada y Asakura (1996) desarrollaron expresiones que proporcionan la fuerza de gradiente (Ecuación A.1) y la fuerza de esparcimiento (Ecuación A.2) existentes en una PO basándose en la aproximación de Rayleigh y en la suposición de que el haz de atrapamiento se encuentra débilmente enfocado.

$$\vec{F}_{grad}(\vec{r}) = \frac{2\pi n_{med} a^3}{c} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I(\vec{r}), \quad (A.1)$$

$$\vec{F}_{esp}(\vec{r}) = \frac{128\pi^5 n_{med} a^6}{3c\lambda_0^4} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I(\vec{r}) \hat{z}. \quad (A.2)$$

En las Ecuaciones A.1 y A.2  $n_{med}$  es el índice de refracción del medio en que la partícula atrapada se encuentra suspendida,  $a$  es el radio de la partícula atrapada,  $m$  es el índice de refracción relativo medio-partícula (cociente del índice de refracción  $n_p$  de la partícula atrapada y el índice de refracción del medio  $n_{med}$ ),  $I(\vec{r})$  es la intensidad del haz de atrapamiento al interior de la región de atrapamiento,  $\lambda_0$  es la longitud de onda en el aire del láser de atrapamiento y  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío. Debido a que la intensidad del haz de atrapamiento puede ser descrita como gaussiana tanto en dirección transversal como en dirección axial (Harada y Asakura 1996), los gradientes de intensidad de dicho haz producen una fuerza conservativa capaz de mantener atrapada a una partícula. En la Ecuación A.2 se puede observar que la fuerza de esparcimiento es no conservativa y actúa siempre en la dirección de propagación del haz por lo que, para tener un atrapamiento estable en 3-D, es necesario que la magnitud de la componente de la fuerza de gradiente en esa misma dirección sea mayor que la magnitud de la fuerza de esparcimiento.

De las Ecuaciones A.1 y A.2 se pueden observar los efectos dominantes implicados al variar los parámetros que aparecen en éstas. Por ejemplo, se puede notar que al disminuir el radio de la partícula atrapada la fuerza debida al esparcimiento disminuye en mayor medida que la fuerza de gradiente, lo que podría significar que un atrapamiento estable en 3-D es más fácil de obtener conforme se disminuye el tamaño de la partícula. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que existe una fuerza aleatoria actuando sobre la

partícula atrapada como efecto de la energía térmica del fluido y que para lograr un atrapamiento estable en 3-D la altura máxima del potencial creado por la PO (el potencial proviene de la integral de la Ecuación A.1 (Woerdemann 2012)) debe ser mucho más grande (típicamente diez veces más grande (Li 2011)) que la energía térmica promedio  $\frac{1}{2}k_B T$  de dicha partícula. Lo anterior es con la intención de asegurar que la energía térmica instantánea de la partícula nunca llegue a ser mayor que la altura del potencial creado por la PO. Lo cierto es que entre más pequeña sea la partícula atrapada menor será la disipación de energía por efectos de la viscosidad del fluido y dicha partícula tendrá mayor variabilidad alrededor de su energía térmica promedio, aumentándose la probabilidad de que la partícula atrapada alcance una energía instantánea mayor a la altura del potencial creado por la PO, dificultándose el atrapamiento (Woerdemann 2012). Por lo anterior, debe haber un compromiso en el tamaño de la partícula para lograr aumentar el cociente entre fuerza de gradiente y fuerza de esparcimiento sin aumentar demasiado la difusividad de la partícula que tiene un efecto adverso en el atrapamiento estable.

De las Ecuaciones A.1 y A.2 puede observarse también que el cociente entre fuerza de gradiente y fuerza de esparcimiento será mayor cuando la partícula atrapada se encuentre suspendida en agua que cuando se encuentre suspendida en aire debido a la diferencia entre el índice de refracción relativo bajo una y otra circunstancia. Debe notarse que la difusividad de una partícula suspendida en aire a determinada temperatura es mayor a la de una partícula suspendida en agua a esa misma temperatura, lo que dificulta aún más el atrapamiento en aire en comparación con el atrapamiento en agua. Por otro lado, analizando el efecto del aumento de índice de refracción de la partícula atrapada se puede observar que dicho aumento disminuye el cociente entre la fuerza de gradiente y la fuerza de esparcimiento, es decir, resulta más difícil lograr un atrapamiento estable en 3-D al utilizar partículas de poliestireno ( $n_p = 1.57$ ) que al emplear partículas de sílica ( $n_p = 1.45$ ), siempre que se realice el atrapamiento de ambas partículas en el mismo medio.

Siempre que se garanticen las condiciones necesarias para el uso de la aproximación de Rayleigh, es decir, siempre que el diámetro de la partícula atrapada sea al menos cinco veces más pequeño que la longitud de onda del láser, esta aproximación podrá brindar información cuantitativa de las fuerzas ejercidas por la PO sobre una partícula atrapada con muy buena aproximación (Nieminen *et al.* 2010). Más aun, de un análisis cuantitativo de dichas fuerzas (Figura A.1) puede corroborarse que bajo el régimen de Rayleigh existe una región tridimensional dentro de la que la PO puede ser vista como un resorte con cierta constante de rigidez. Esto es, el comportamiento de una pinza óptica es cualitativamente el mismo independientemente del tamaño de la partícula atrapada en relación a la longitud de onda del láser de atrapamiento, puesto que la región lineal antes mencionada también puede observarse al analizar cuantitativamente, con la aproximación pertinente, las fuerzas ejercidas por una PO sobre una partícula atrapada cuando el tamaño de ésta es mucho mayor que la longitud de onda del láser de atrapamiento.

La Figura A.1 muestra las fuerzas que ejerce una PO sobre una partícula de 50 nm de diámetro suspendida en aire. En A.1a se observa que la fuerza ejercida en dirección

transversal sobre la partícula atrapada tiene una región lineal, mientras que en A.1b se aprecia igualmente la existencia de una región lineal, formándose un atrapamiento estable toda vez que la fuerza de gradiente es superior a la de esparcimiento. El centro del potencial creado se localiza ligeramente adelante del origen en dirección  $z$  debido a la acción de la fuerza de gradiente. Las fuerzas de atrapamiento están normalizadas respecto a la fuerza de gravedad ejercida sobre la partícula para proveer de una referencia intuitiva de la magnitud de las primeras.

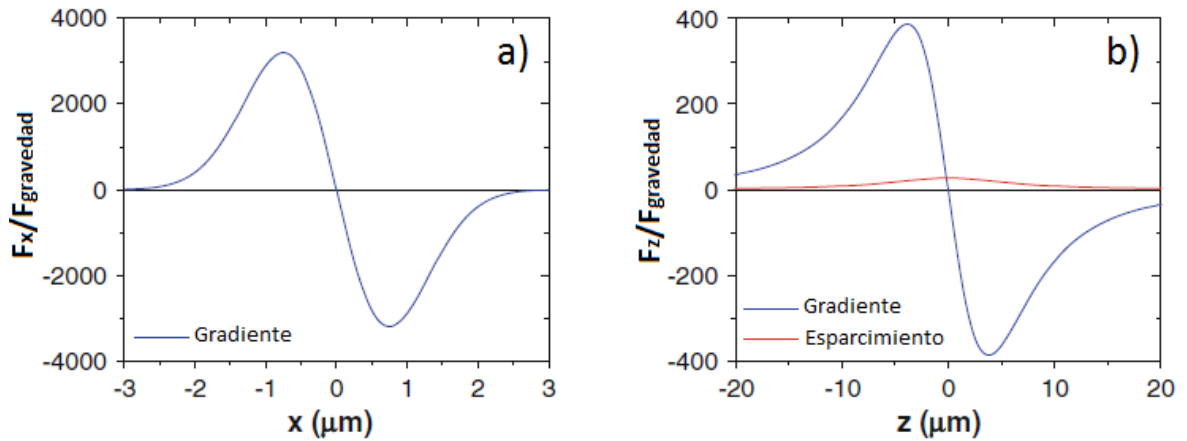


Figura A.1 Fuerzas ejercidas sobre una partícula en dirección a) transversal y b) axial. Las fuerzas fueron calculadas con la aproximación de Rayleigh para un tamaño de partícula suspendida en aire con un diámetro de 50 nm. Las fuerzas se encuentran normalizadas con respecto a la fuerza de gravedad. Figura tomada y adaptada de Li (2011).



## Apéndice B: Método de detección en el plano focal posterior

Un fotodetector de cuadrante (FDC) es un dispositivo transductor de luz que proporciona señales eléctricas en respuesta a la radiación óptica que incide sobre las cuatro superficies activas o cuadrantes en las que se encuentra dividido. Un fotodetector PDQ80A de Thorlabs (Figura B.1), como el usado en el arreglo experimental reportado en el [Capítulo 3](#), proporciona tres señales de potencial eléctrico: una proporcional a la resta de la intensidad incidente sobre los cuadrantes 2 y 3 y la intensidad incidente sobre los cuadrantes 1 y 4 (señal  $x$ ), otra proporcional a la resta de la intensidad incidente sobre los cuadrantes 1 y 2 y la intensidad incidente sobre los cuadrantes 3 y 4 (señal  $y$ ), y una última proporcional a la suma de las intensidades incidentes en los cuatro cuadrantes (señal  $z$ ). Si lo que incide sobre las superficies activas del FDC es, por ejemplo, un haz láser con perfil de intensidad gaussiano que se propaga en dirección perpendicular a los cuadrantes del FDC, la primera señal proporcionará información sobre la posición del haz en dirección horizontal y es por ello que se le llama señal  $x$ , mientras que la segunda señal proporcionará información de la posición del haz en dirección vertical y es por ello que se le llama señal  $y$ .

Para observar el movimiento de una partícula atrapada en una PO auxiliándose de un FDC se puede recurrir al método de detección en el plano focal posterior (DPFP) (Allerma *et al.* 1998). Con este método se requiere de un arreglo como el mostrado en la Figura B.2 donde, al estar una partícula atrapada en la PO formada por el haz incidente, se forman patrones de intensidad producidos en el plano focal posterior (PFP) del condensador como efecto de la interferencia entre la luz del haz que es esparcida por la partícula atrapada y la no esparcida. La imagen de los patrones de interferencia formados en el PFP del condensador es llevada a las superficies activas del FDC por medio de una lente con distancia focal  $f$ , colocada a una distancia de  $2f$  del PFP del condensador. Por su parte las superficies activas del FDC se encuentran a una distancia  $2f$  de dicha lente. Con el arreglo mencionado, la señal  $x$  generada por el FDC proporcionará información de la posición de la partícula atrapada en la dirección horizontal, mientras que la señal  $y$  proporcionará información de la posición de la partícula atrapada en la dirección vertical. Una característica importante del método de DPFP es que por medio de éste, se puede obtener información sobre la posición axial de la partícula a través de la señal proporcional a la suma de las intensidades incidentes en las cuatro áreas activas (señal  $z$ ) (Pralle *et al.* 1999; Rohrbach y Stelzer 2002b).

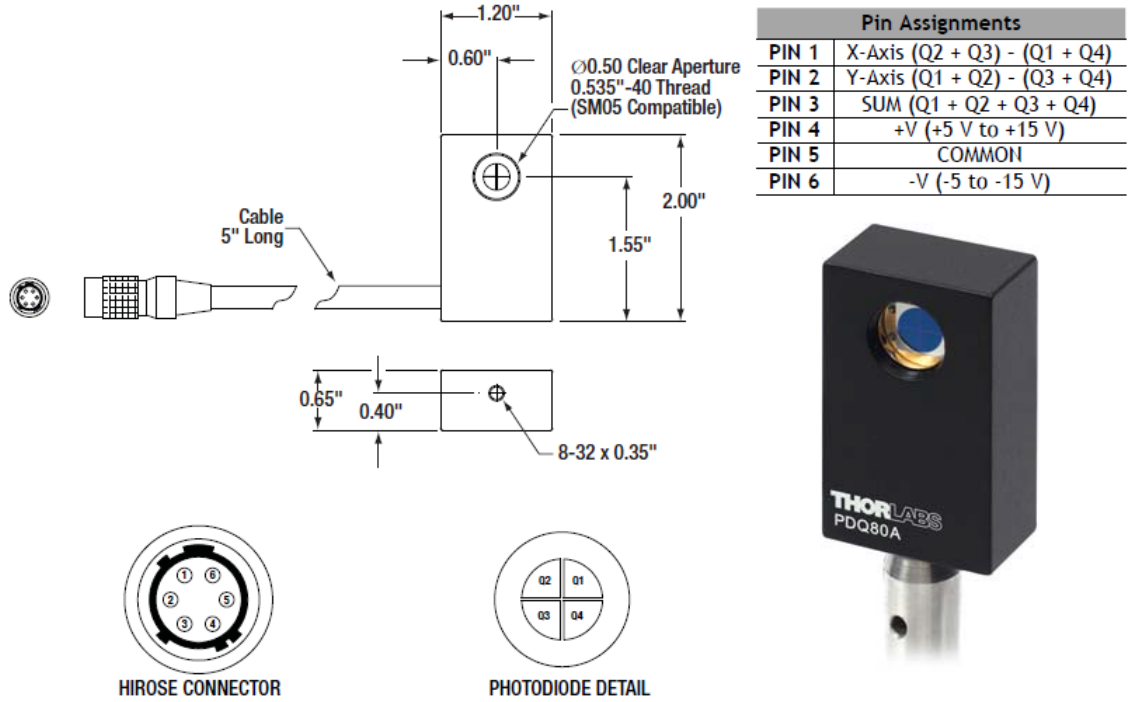


Figura B.1 Fotodetector de cuadrante PDQ80A de Thorlabs.

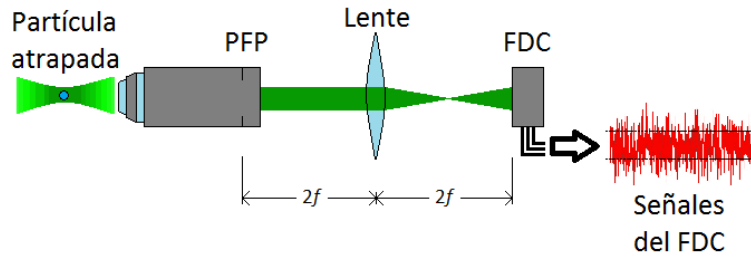


Figura B.2 Configuración mediante la que la imagen del PFP del condensador es llevada a la superficie activa del FDC en el método de DPFP.

## Apéndice C: Circuito de amplificación y filtrado antialias

Cuando una señal es muestreada a una frecuencia de muestreo  $f_m$ , la componente de la señal con la frecuencia más alta que puede ser observada sin ambigüedad es igual a  $f_{Nyq} = f_m/2$ , que es la llamada frecuencia de Nyquist, puesto que al menos se puede observar cada cresta y cada valle de una señal con tal frecuencia. Como se muestra en la Figura C.1a, cualquier componente con frecuencia mayor a  $f_{Nyq}$  puede ser erróneamente interpretada como una componente de frecuencia menor a  $f_{Nyq}$ . Bajo tal situación, la densidad espectral de potencia (DEP)  $S(f)$  de las componentes de la señal con frecuencias mayores a  $f_{Nyq}$  será erróneamente incluida dentro de la DEP de las componentes con frecuencia menor a  $f_{Nyq}$  (Figura C.1b). El fenómeno anterior es conocido como fenómeno de alias y una forma de evitarlo es filtrar la señal con un filtro análogo pasa bajas antes de que ésta sea muestreada. La frecuencia de corte de tal filtro (llamado “antialias”) debe ser igual la frecuencia de Nyquist (Gittes y Schmidt 1997).

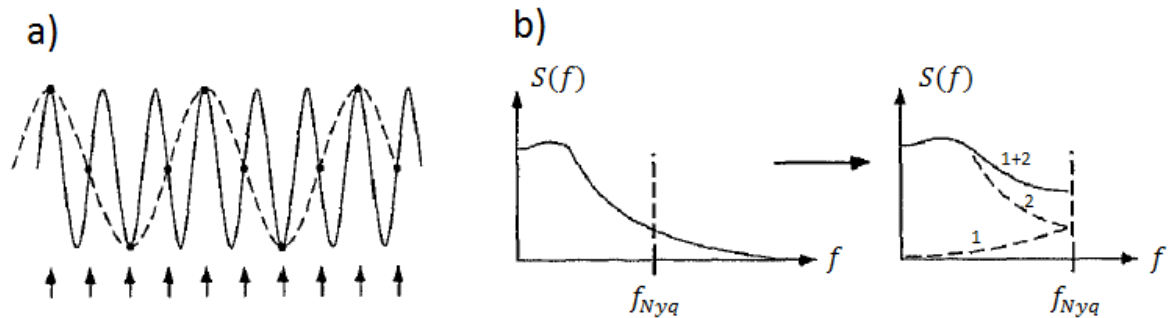


Figura C.1 Ilustración esquemática del fenómeno de alias. a) Una onda sinusoidal (línea sólida) tiene una frecuencia que es  $3/4$  de la frecuencia de muestreo  $f_s$  (flechas). Lo anterior contribuye de forma errónea a la componente de la DEP igual a  $f_s/4$  (línea punteada). b) para una DEP continua, las componentes de la señal con frecuencias mayores a la frecuencia de Nyquist (curva 1) contribuyen a la DEP de frecuencias menores a  $f_{Nyq}$  (curva 2) para producir una DEP alterada por el fenómeno de alias (curva 1+2). Figura tomada y adaptada de Gittes and Schmidt (1997).

La Figura C.2 muestra el diagrama del circuito utilizado para amplificar y filtrar las señales provenientes del fotodetector de cuadrante (FDC). Dicho circuito fue diseñado e implementado en el laboratorio. La ganancia nominal de cada uno de los amplificadores no inversores implementados es de 14.3 dB (Franco 2005). Los filtros análogos de ganancia unitaria implementados son de segundo orden (Franco 2005) y tienen frecuencias de corte reales cercanas a los 25 kHz (24.9 kHz, 25.3 kHz y 25.9 kHz para los filtros correspondientes a las señales  $x$ ,  $y$  y  $z$ , respectivamente). Dichas frecuencias de corte fueron calculadas basándose en mediciones de resistencia y capacitancia de los componentes utilizados y verificadas experimentalmente, observando la frecuencia a la que la señal de salida de los filtros se desfasa respecto a una señal de entrada en noventa grados (Franco 2005). Cada uno de los amplificadores operacionales utilizados en el circuito de amplificación y filtrado corresponde al modelo TL081A de Texas Instruments y fueron alimentados con un potencial de  $\pm 15$  V proporcionado por una fuente de corriente directa (PSB-01 de K&H Products). Se eligió de 25 kHz la frecuencia de corte de los filtros análogos debido a que la frecuencia de muestreo de las señales provenientes del

fotodetector de cuadrante (FDC) durante los experimentos fue de 50 KHz. De esta manera, los filtros analógicos utilizados cumplieron la función de eliminar el fenómeno de alias en las señales adquiridas durante los experimentos.

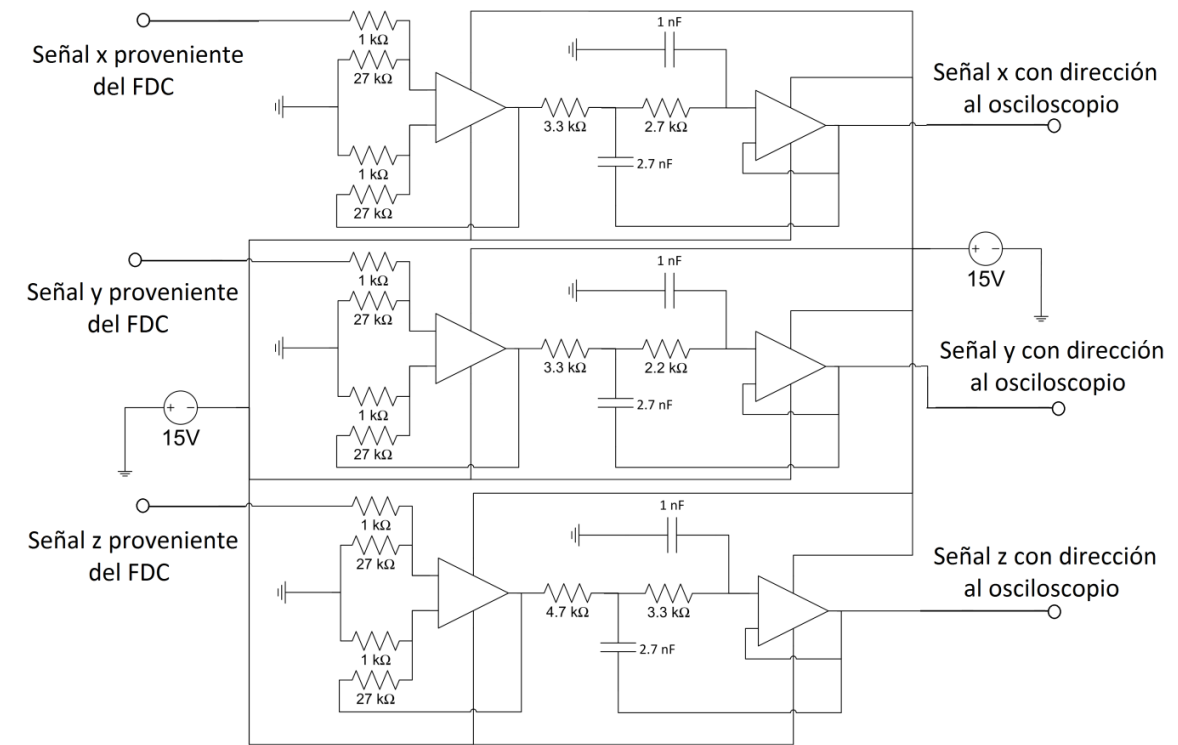


Figura C.2 Circuito de amplificación y filtrado antialias.

# Apéndice D: Determinación de la densidad espectral de potencia de una señal por medio de filtros digitales

A continuación se explican los conceptos que justifican el método que proponemos para determinar tanto el factor de calibración de un fotodetector de cuadrante (FDC) como la constante de rigidez de una pinza óptica (PO). El método se basa en la medición de las varianzas de la señales provenientes del detector que son filtradas con un filtro digital sintonizado a diferentes frecuencias. Para los conceptos sobre series de Fourier, transformada de Fourier, linealidad e invariancia en el tiempo de un sistema y filtrado se tomó como fuente a Chaparro (2010).

La representación en series de Fourier de una señal  $x(t)$  continua y periódica con periodo fundamental  $T_0$ , está dada por una suma infinita de exponenciales complejas multiplicadas por un factor de peso, cuya frecuencia para cada exponencial es múltiplo de la frecuencia fundamental  $f_0 = 1/T_0$  (Hz) de la señal  $x(t)$ :

$$x(t) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} X_k e^{j2\pi k f_0 t}, \quad (\text{D. 1})$$

donde los factores de peso  $X_k$  (coeficientes de Fourier) están dados por

$$X_k = \frac{1}{T_0} \int_{t_0}^{t_0+T_0} x(t) e^{-j2\pi k f_0 t} dt, \quad (\text{D. 2})$$

para  $k = 0, \pm 1, \pm 2 \dots$  y cualquier  $t_0$ .

Existe una relación importante entre la potencia de una señal periódica calculada en el dominio del tiempo y los coeficientes de Fourier, denominada relación de potencia de Parseval:

$$P_x \equiv \frac{1}{T_0} \int_{t_0}^{t_0+T_0} |x(t)|^2 dt = \sum_{k=-\infty}^{\infty} |X_k|^2. \quad (\text{D. 3})$$

Aún más, considerando a la señal como una suma de componentes armónicamente relacionados:

$$x(t) = \sum_k X_k e^{j2\pi k f_0 t} \equiv \sum_k x_k(t), \quad (\text{D. 4})$$

puede demostrarse que

$$\frac{1}{T_0} \int_{t_0}^{t_0+T_0} |x_k(t)|^2 dt = |X_k|^2. \quad (\text{D. 5})$$

Es decir, la potencia de una de las  $k$  componentes armónicas de la señal  $x(t)$  puede calcularse en función del coeficiente de Fourier correspondiente a dicha componente. Es

decir, si fuéramos capaces de observar solamente la componente de la señal con frecuencia  $kf_0$ , veríamos que su potencia, inicialmente definida en el dominio del tiempo, corresponde al cuadrado del módulo del coeficiente de Fourier de dicha componente, y entonces, la potencia total puede verse como la contribución de cada una de las componentes armónicas de la señal periódica. La forma como la potencia se encuentra repartida en cada una de las componentes puede apreciarse al graficar  $|X_k|^2$  contra las frecuencias armónicas de  $x(t)$ , lo que es similar a la densidad espectral de potencia (DEP) que se definirá más adelante, salvo que solo tiene valores a frecuencias específicas.

La Ecuación D.5 puede utilizarse para relacionar la contribución a la varianza total de la señal periódica por parte de una de las  $k$  componentes de dicha señal con su respectivo coeficiente de Fourier. La varianza de una señal, al desarrollar el binomio al cuadrado que la define, puede escribirse como

$$\langle (x(t) - \bar{x}(t))^2 \rangle = \langle x^2(t) \rangle - \langle x(t) \rangle^2, \quad (D.6)$$

en donde el segundo término del lado derecho es simplemente el promedio de la señal al cuadrado, y el primer término del lado derecho corresponde al lado izquierdo de la Ecuación D.5, y por lo tanto tenemos que la contribución a la varianza total por parte de una de las  $k$  componentes de la señal es, para  $k \neq 0$ ,

$$\langle (x_k(t) - \bar{x}_k(t))^2 \rangle = |X_k|^2 - \langle x_k(t) \rangle^2 = |X_k|^2, \quad (D.7)$$

mientras que por la definición del coeficiente de Fourier  $X_{k=0}$  (componente de “corriente directa”) se tiene que

$$\langle (x_k(t) - \bar{x}_k(t))^2 \rangle = |X_k|^2 - \langle x_k(t) \rangle^2 = 0. \quad (D.8)$$

De manera similar se observa que la varianza total de la señal es

$$\langle (x(t) - \bar{x}(t))^2 \rangle = 2 \sum_{k=1}^{\infty} |X_k|^2, \quad (D.9)$$

donde se ha evitado realizar la sumatoria desde  $-\infty$  al multiplicar por dos la sumatoria desde 1.

De manera similar a cómo la varianza de una señal periódica, que denotaremos ahora como  $\tilde{x}(t)$ , puede relacionarse con sus coeficientes de Fourier, existe una relación entre la varianza de una señal no periódica  $x(t)$  y su transformada de Fourier.

Una señal no periódica  $x(t)$  puede verse como una señal periódica  $\tilde{x}(t)$  con un periodo fundamental infinito  $T_0$ :

$$x(t) = \lim_{T_0 \rightarrow \infty} \tilde{x}(t) \quad (D.10)$$

con la siguiente representación en series de Fourier:

$$\tilde{x}(t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} X_n e^{j2\pi n f_0 t}, \quad f_0 = \frac{1}{T_0}, \quad (D.11)$$

donde

$$X_n = \frac{1}{T_0} \int_{-\frac{T_0}{2}}^{\frac{T_0}{2}} \tilde{x}(t) e^{-j2\pi n f_0 t} dt \quad (\text{D.12})$$

Sin embargo en la Ecuación D.12 se aprecia que cuando  $T_0 \rightarrow \infty$ ,  $X_n \rightarrow 0$ . Para evitar esto, se define  $X(f_n) \equiv T_0 X_n$ , donde  $\{f_n \equiv n f_0\}$  son las frecuencias armónicas. Siendo  $\Delta f = f_0$  la frecuencia entre armónicos, las Ecuaciones D.11 y D.12 pueden escribirse como

$$\tilde{x}(t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \frac{X(f_n)}{T_0} e^{j2\pi f_n t} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} X(f_n) e^{j2\pi f_n t} \Delta f, \quad (\text{D.13})$$

$$X(f_n) = \int_{-\frac{T_0}{2}}^{\frac{T_0}{2}} \tilde{x}(t) e^{-j2\pi f_n t} dt. \quad (\text{D.14})$$

Conforme  $T_0 \rightarrow \infty$ ,  $\Delta f \rightarrow df$ , la sumatoria se vuelve una integral, mientras que  $f_n = n f_0 = n \Delta f \rightarrow f$ :

$$x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} X(f) e^{j2\pi f t} df, \quad (\text{D.15})$$

$$X(f) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{-j2\pi f t} dt. \quad (\text{D.16})$$

La Ecuación D.16 representa la transformada de Fourier de la señal no periódica  $x(t)$ , que es similar a la expresión para los coeficientes de Fourier (Ecuación D.2), salvo que está multiplicada por el periodo  $T_0$  conceptualmente infinito.

Se puede plantear una expresión que relaciona la energía de una señal calculada en el dominio del tiempo, con la energía de esa misma señal calculada en el dominio de la frecuencia, llamada relación de energía de Parseval:

$$E_x \equiv \int_{-\infty}^{\infty} |x(t)|^2 dt = \int_{-\infty}^{\infty} |X(f)|^2 df, \quad (\text{D.17})$$

donde  $|X(f)|^2$  se conoce como densidad espectral de energía (DEE) pues al graficar esta cantidad contra la frecuencia, se observa la cantidad de energía contenida en cada valor de frecuencia. Una expresión para la potencia sería

$$P_x \equiv \lim_{T_0 \rightarrow \infty} \frac{1}{T_0} \int_{-\infty}^{\infty} |x(t)|^2 dt = 2 \int_{0+}^{\infty} \lim_{T_0 \rightarrow \infty} \frac{|X(f)|^2}{T_0} df, \quad (\text{D.18})$$

donde a la cantidad  $2 \lim_{T_0 \rightarrow \infty} \frac{|X(f)|^2}{T_0}$  se le conoce como densidad espectral de potencia (DEP) pues al graficar esta cantidad contra la frecuencia se observa la cantidad de potencia contenida en cada valor de frecuencia. De forma similar a las series de Fourier de una señal periódica, la DEP está relacionada con la varianza total de la señal no periódica  $x(t)$ :

$$\langle (x(t) - \bar{x}(t))^2 \rangle = 2 \int_{0+}^{\infty} \lim_{T_0 \rightarrow \infty} \frac{|X(f)|^2}{T_0} df. \quad (D.19)$$

Más aún, el doble del valor de la DEP a la frecuencia  $f$  da la contribución de esta frecuencia a la varianza total de la señal  $x(t)$  (sin embargo, para una señal no periódica, existen contribuciones infinitas e infinitesimalmente pequeñas). Supongamos que tenemos una señal no periódica  $x(t)$  que contiene todas las frecuencias desde 0 hasta  $\infty$ , que obtenemos su transformada de Fourier, y que luego realizamos la siguiente integral:

$$2 \int_0^{f_c} \lim_{T_0 \rightarrow \infty} \frac{|X(f)|^2}{T_0} df. \quad (D.20)$$

El resultado numérico de la integral anterior correspondería a la varianza de una señal  $y(t)$ , donde  $y(t)$  es igual a la señal  $x(t)$  salvo que contiene únicamente y de manera inalterada las componentes de ésta última a frecuencias entre 0 y  $f_c$ . La idea de conservar sólo las componentes a ciertas frecuencias de la infinidad que tiene una señal no periódica se relaciona con el concepto de filtrado.

Paréntesis: A pesar de que todos los conceptos manejados anteriormente fueron contruidos bajo la suposición de que la señal  $x(t)$ , ya sea periódica o no periódica, es continua en el tiempo, se pueden establecer conceptos muy similares para el caso de señales discretas de tal manera que la varianza de este tipo de señales podría calcularse también a partir de la DEP, que para este caso sería discreta.

Para entender el concepto de filtrado es necesario definir lo que es un sistema lineal e invariante en el tiempo y comprender el comportamiento de tal sistema cuando recibe como entrada una función exponencial compleja.

Un sistema lineal invariante en el tiempo es una transformación de una señal de entrada  $x(t)$  en una señal de salida  $y(t) = S[x(t)]$  que cumple con las propiedades de linealidad y de invariancia en el tiempo.

Linealidad:

Dadas las señales de entrada  $x(t)$  y  $v(t)$ , y las constantes  $\alpha$  y  $\beta$ , la transformación cumple que

$$S[\alpha x(t) + \beta v(t)] = \alpha S[x(t)] + \beta S[v(t)]. \quad (D.21)$$

Invariancia en el tiempo:

Dada una señal de entrada  $x(t)$  y su transformación  $y(t) = S[x(t)]$ , el sistema cumple que

$$x(t \mp \tau) \Rightarrow y(t \mp \tau) = S[x(t \mp \tau)]. \quad (D.22)$$

Las dos propiedades anteriores son las que permiten expresar la salida  $y(t)$  que un sistema lineal e invariante en el tiempo tiene para cualquier señal de entrada  $x(t)$  que pueda expresarse como  $x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} x(\tau) \delta(t - \tau) d\tau$ , en función de la propia señal de entrada y de la respuesta al impulso del sistema mediante la integral de convolución dada por la Ecuación D.23. La respuesta al impulso del sistema  $h(t)$  se define como la salida del



sistema cuando recibe como entrada un impulso  $\delta(t)$  bajo condiciones iniciales iguales a cero.

$$y(t) = \int_{-\infty}^{\infty} x(\tau)h(t - \tau)d\tau = \int_{-\infty}^{\infty} x(t - \tau)h(\tau)d\tau. \quad (\text{D. 23})$$

Para sistemas cuya respuesta al impulso es cero para  $t < 0$  (sistemas causales) la Ecuación D.23 puede escribirse como

$$y(t) = \int_0^{\infty} x(\tau)h(t - \tau)d\tau = \int_0^{\infty} x(t - \tau)h(\tau)d\tau. \quad (\text{D. 24})$$

Los sistemas lineales e invariantes en el tiempo tienen un comportamiento peculiar cuando su entrada es una función exponencial compleja  $x(t) = e^{j2\pi f_0 t}$ , para cualquier frecuencia  $f_0$  y con  $-\infty < t < \infty$ , pues su salida dada por la integral de convolución es

$$y(t) = e^{j2\pi f_0 t} H(f_0) = x(t)H(f_0), \quad (\text{D. 25})$$

donde

$$H(f_0) = \int_0^{\infty} h(\tau)e^{-j2\pi f_0 \tau} d\tau \quad (\text{D. 26})$$

es la respuesta del sistema a la frecuencia  $f_0$ .

Es decir, cuando la entrada a un sistema lineal e invariante en el tiempo es una exponencial compleja de cierta frecuencia  $f_0$ , la salida del sistema es igual a la entrada multiplicada por una constante que está relacionada con la manera como el sistema responde a la frecuencia de la señal de entrada.

Lo anterior puede aplicarse a una señal que es una combinación lineal de exponenciales complejas con diferentes amplitudes, frecuencias y fases (por ejemplo una señal periódica expresada en su serie de Fourier):

$$x(t) = \sum_k X_k e^{j2\pi f_k t}. \quad (\text{D. 27})$$

La respuesta del sistema lineal e invariante en el tiempo para una entrada como la de la Ecuación D.27 puede obtenerse por superposición como

$$\begin{aligned} y(t) &= \sum_k X_k e^{j2\pi f_k t} H(f_k) \\ &= \sum_k X_k |H(f_k)| e^{j(2\pi f_k t + \angle H(f_k))}, \end{aligned} \quad (\text{D. 28})$$

donde se aprecia que cada componente de la señal  $x(t)$  es modificada en su amplitud por un factor  $|H(f_k)|$  (magnitud de la respuesta del sistema a la frecuencia) y en su fase por la adición de  $\angle H(f_k)$  (fase de la respuesta del sistema a la frecuencia).

Si la señal es una suma infinita de exponenciales complejas con sus frecuencias y amplitudes variando continuamente (por ejemplo está dada en términos de la transformada inversa de Fourier):

$$x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} X(f)e^{j2\pi ft} df, \quad (D.29)$$

la salida estaría dada por

$$y(t) = \int_{-\infty}^{\infty} X(f)|H(f)| e^{j(2\pi ft + \angle H(f))} df. \quad (D.30)$$

Un filtro ideal es un sistema lineal e invariante en el tiempo cuya respuesta a la frecuencia es tal que permite conservar inalteradas las componentes de una señal que se encuentran dentro de un rango de frecuencias determinado, es decir, la magnitud de su respuesta a la frecuencia es uno dentro del rango deseado, mientras que la fase de dicha respuesta es cero (Figura D.1).

Nota: A pesar de que los conceptos manejados anteriormente fueron construidos bajo la suposición de que se trabajaba con sistemas continuos en el tiempo, se pueden establecer conceptos muy similares para el caso de sistemas discretos (digitales).

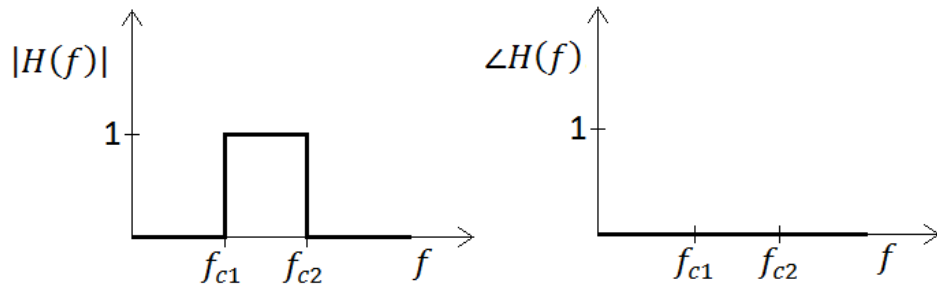


Figura D.1 Respuesta a la frecuencia de la magnitud y la fase de un filtro ideal.

Con un filtro digital cuya respuesta a la frecuencia es la que muestra la Figura D.1, podríamos hacer el siguiente ejercicio mental: supongamos que tenemos una señal no periódica  $x(t)$  discreta y cuya potencia se encuentra equitativamente distribuida sobre todas las frecuencias muestreadas, siendo  $f_m$  la frecuencia de muestreo. Si se desprecian los efectos de alias, tal señal tendría una DEP como se muestra en la Figura D.2.

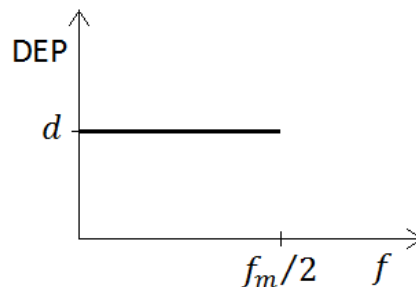


Figura D.2 DEP esperada en una señal cuya potencia está equitativamente distribuida sobre todas las frecuencias muestreadas.

Como cada punto de la DEP está relacionado con una contribución a la varianza total de la señal, si filtráramos la señal  $x(t)$  con un filtro digital ideal como el de la Figura D.1, sintonizado en  $f = (f_{c1} + f_{c2})/2$ , y obtuviéramos la varianza de la señal filtrada  $y(t)$ , por medio de los métodos estadísticos convencionales en el dominio del tiempo, encontraríamos que ésta tiene una relación con el valor constante de la DEP  $d$  y el ancho de banda del filtro digital ideal:

$$\langle (y(t) - \bar{y}(t))^2 \rangle = d(f_{c2} - f_{c1}), \quad (D.31)$$

mientras que la varianza de la señal original  $x(t)$  podría calcularse como

$$\langle (x(t) - \bar{x}(t))^2 \rangle = \langle (y(t) - \bar{y}(t))^2 \rangle \frac{f_m}{2(f_{c2} - f_{c1})}. \quad (D.32)$$

Esto es, la varianza de la señal filtrada multiplicada por el número de veces que cabe la banda de paso del filtro dentro del ancho de banda total comprendido por la señal, da la varianza total de la señal original  $x(t)$ .

Nótese que si el filtrado se repitiera  $n$  veces con un filtro digital ideal del mismo ancho de banda pero sintonizado en frecuencias diferentes dentro de un rango de 0 a  $f_m/2$ , la varianza de la señal filtrada sería la misma en cada uno de los  $n$  procesos de filtrado y se podría construir una curva (una línea horizontal en realidad) con la varianza de la señal procedente de cada filtrado. La integral de dicha curva desde cero hasta  $f_m/2$ , dividida entre el ancho de la banda de paso del filtro, también proporcionaría la varianza total de la señal original  $x(t)$ .

En la práctica no es posible obtener filtros digitales ideales. Sin embargo es posible obtener filtros digitales cuya magnitud de su respuesta a la frecuencia es cercana a uno dentro de un rango de frecuencias (banda de paso) y cercana a cero más allá de cierto valor de frecuencia (banda de rechazo), mientras que la fase de su respuesta a la frecuencia es lineal dentro de la banda de paso (Figura D.3). Puede demostrarse que si la fase de la respuesta a la frecuencia de un filtro es lineal, no se producirá una distorsión en la señal filtrada, solo un retraso de ésta en el dominio del tiempo.

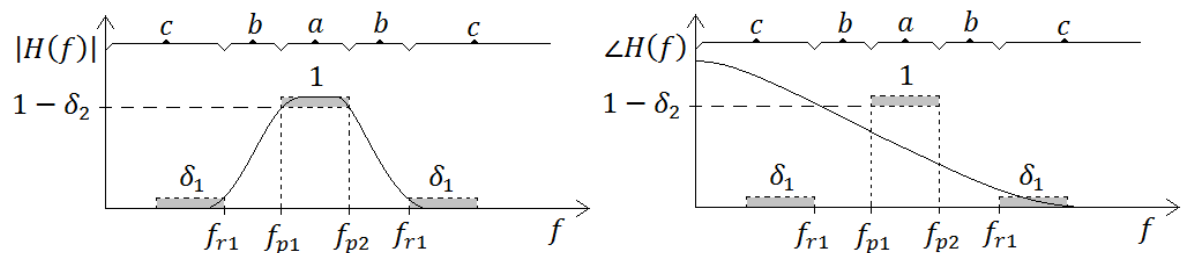


Figura D.3 Respuesta a la frecuencia de la magnitud y la fase de un filtro digital real.  $1 - \gamma_2$  es la atenuación máxima permitida en la banda de paso y  $\gamma_1$  es la atenuación mínima permitida en la banda de rechazo. Las regiones  $a$ ,  $b$  y  $c$  corresponden a las bandas de paso, transición y rechazo, respectivamente.

Supongamos nuevamente que tenemos una señal no periódica  $x(t)$  discreta y cuya potencia se encuentra equitativamente distribuida sobre todas las frecuencias muestreadas (siendo  $f_m$  la frecuencia de muestreo). Tal señal tendría una DEP como la de la Figuras D.2 si se desprecian los efectos de alias. Sin embargo, si filtráramos la señal  $x(t)$

con un filtro digital real como el de la Figura D.3, sintonizado en  $f = (f_{p1} + f_{p2})/2$ , tendríamos que la varianza de la señal filtrada  $y(t)$  correspondería a un valor intermedio entre  $d(f_{p2} - f_{p1})$  y  $d(f_{r2} - f_{r1})$ . Si consideramos que la fase de la respuesta a la frecuencia del filtro se comporta linealmente dentro de la banda de paso y aproximadamente lineal dentro de la banda de transición, de tal manera que las distorsiones producidas por la no linealidad dentro de dicha banda de transición son despreciables, tenemos que el único efecto apreciable del filtro será “pesar” de diferente manera las componentes de la señal  $x(t)$  que se encuentran entre  $f_{r1}$  y  $f_{r2}$ , y multiplicar por un valor muy cercano a cero a las componentes de la señal que no se encuentren dentro de dicha banda. Entonces puede establecerse un ancho de banda equivalente  $h_e$  para el filtro, correspondiente a la integral de la magnitud de su respuesta a la frecuencia:

$$h_e = \int_0^{f_m/2} |H(f)| df. \quad (D.33)$$

Entonces se tendría que la varianza de la señal filtrada  $y(t)$ , calculada por los métodos estadísticos convencionales, estaría relacionada con  $d$  y con  $h_e$  de la siguiente forma:

$$\langle (y(t) - \bar{y}(t))^2 \rangle = dh_e, \quad (D.34)$$

mientras que la varianza de la señal original  $x(t)$  podría calcularse como

$$\langle (x(t) - \bar{x}(t))^2 \rangle = \langle (y(t) - \bar{y}(t))^2 \rangle \frac{f_m}{2h_e}. \quad (D.35)$$

Nótese de nuevo que si el filtrado se repitiera  $n$  veces a través de un filtro digital con la misma banda equivalente pero sintonizado a frecuencias diferentes dentro de un rango de 0 a  $f_m/2$ , la varianza de la señal filtrada sería la misma en cada uno de los  $n$  procesos de filtrado y se podría construir una curva (una línea horizontal en realidad) con la varianza de la señal procedente de cada filtrado. La integral de dicha curva desde cero hasta  $f_m/2$ , dividida entre el ancho de banda equivalente del filtro, también proporcionaría la varianza total de la señal original  $x(t)$ .

# Bibliografía

ADRIAN, Ronald J. Particle-imaging techniques for experimental fluid mechanics. *Annual review of fluid mechanics*, 1991, vol. 23, no 1, p. 261-304.

ALBRECHT, H.-E., et al. *Laser Doppler and phase Doppler measurement techniques*. Springer Science & Business Media, 2013.

ALLERSMA, Miriam W., et al. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophysical journal*, 1998, vol. 74, no 2, p. 1074-1085.

ANDERSSON, Magnus; CZERWINSKI, Fabian; ODDERSHEDE, Lene Broeng. Optimizing active and passive calibration of optical tweezers. *Journal of optics*, 2011, vol. 13, no 4, p. 044020.

ASHKIN, Arthur, et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 1986, vol. 11, no 5, p. 288-290.

ASHKIN, Arthur. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical journal*, 1992, vol. 61, no 2, p. 569.

BERG-SØRENSEN, Kirstine, et al. Unintended filtering in a typical photodiode detection system for optical tweezers. *Journal of applied physics*, 2003, vol. 93, no 6, p. 3167-3176.

BERG-SØRENSEN, Kirstine; FLYVBJERG, Henrik. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 2004, vol. 75, no 3, p. 594-612.

BOWN, M. R., et al. Three-dimensional, three-component velocity measurements using stereoscopic micro-PIV and PTV. *Measurement Science and Technology*, 2006, vol. 17, no 8, p. 2175.

BOX, George EP; HUNTER, William Gordon; HUNTER, J. Stuart. *Estadística para investigadores*. Reverté, 1993.

BUOSCIOLO, A.; PESCE, G.; SASSO, A. New calibration method for position detector for simultaneous measurements of force constants and local viscosity in optical tweezers. *Optics communications*, 2004, vol. 230, no 4, p. 357-368.

BÜTTNER, Lars, et al. 2D3C-Laser Doppler Sensor for highly spatially resolved flow field investigations. En *13th International Symposium on Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics, Lissabon*. 2006. p. 1-10.

CHAPARRO, Luis. *Signals and Systems using MATLAB*. Academic Press, 2010.

COWEN, E. A.; MONISMITH, S. G. A hybrid digital particle tracking velocimetry technique. *Experiments in Fluids*, 1997, vol. 22, no 3, p. 199-211.

CROCKER, John C.; GRIER, David G. Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *Journal of colloid and interface science*, 1996, vol. 179, no 1, p. 298-310.

CZARSKE, Jürgen. Laser Doppler velocity profile sensor using a chromatic coding. *Measurement Science and Technology*, 2001, vol. 12, no 1, p. 52.

CZARSKE, Jürgen, BÜTTNER, Lars. Micro Laser Doppler Velocimetry  $\mu$ -LDV. En *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*. Springer, Heidelberg, 2008. P. 1253-1255.

DI LEONARDO, R., *et al.* Multipoint holographic optical velocimetry in microfluidic systems. *Physical review letters*, 2006, vol. 96, no 13, p. 134502.

EOM, Namsoon, *et al.* Probing fluid flow using the force measurement capability of optical trapping. *Advanced Powder Technology*, 2014, vol. 25, no 4, p. 1249-1253.

FLORIN, E.-L., *et al.* Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 1998, vol. 66, p. S75-S78.

FRANCO, Sergio; ENRÍQUEZ BRITO, Javier. *Diseño con amplificadores operacionales y circuitos integrados analógicos*. Mc. Graw Hill 2005.

GITTES, Frederick; SCHMIDT, Christoph F. Signals and noise in micromechanical measurements. *Methods in cell biology*, 1997, vol. 55, p. 129-156.

GITTES, Frederick; SCHMIDT, Christoph F. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Optics letters*, 1998, vol. 23, no 1, p. 7-9.

HARADA, Yasuhiro; ASAKURA, Toshimitsu. Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. *Optics communications*, 1996, vol. 124, no 5, p. 529-541.

HASSAN, Y. A.; CANAAN, R. E. Full-field bubbly flow velocity measurements using a multiframe particle tracking technique. *Experiments in fluids*, 1991, vol. 12, no 1-2, p. 49-60.

HECHT, Eugene. *Optics*. Addison Weley, 2002.

JAMBUNATHAN, K., *et al.* An improved cross correlation technique for particle image velocimetry. *Measurement Science and Technology*, 1995, vol. 6, no 5, p. 507.

KEANE, Richard D.; ADRIAN, Ronald J. Theory of cross-correlation analysis of PIV images. *Applied scientific research*, 1992, vol. 49, no 3, p. 191-215.

KNÖNER, Gregor, *et al.* Characterization of optically driven fluid stress fields with optical tweezers. *Physical Review E*, 2005, vol. 72, no 3, p. 031507.

KÖNIG, Jörg, *et al.* Precise micro flow rate measurements by a laser Doppler velocity profile sensor with time division multiplexing. *Measurement Science and Technology*, 2010, vol. 21, no 7, p. 074005.

LADAVAC, Kosta; GRIER, David. Microoptomechanical pumps assembled and driven by holographic optical vortex arrays. *Optics Express*, 2004, vol. 12, no 6, p. 1144-1149.

LEACH, Jonathan, *et al.* An optically driven pump for microfluidics. *Lab on a Chip*, 2006, vol. 6, no 6, p. 735-739.

LI, Tongcang. *Fundamental tests of physics with optically trapped microspheres*. Springer Science & Business Media, 2011.

MAAS, H. G.; GRUEN, A.; PAPANTONIOU, D. Particle tracking velocimetry in three-dimensional flows. *Experiments in Fluids*, 1993, vol. 15, no 2, p. 133-146.

MALIK, N. A.; DRACOS, Th; PAPANTONIOU, D. A. Particle tracking velocimetry in three-dimensional flows. *Experiments in Fluids*, 1993, vol. 15, no 4-5, p. 279-294.

MEINHART, Carl D.; WERELEY, Steve T.; SANTIAGO, Juan G. PIV measurements of a microchannel flow. *Experiments in fluids*, 1999, vol. 27, no 5, p. 414-419.

MEINHART, C. D.; WERELEY, S. T.; SANTIAGO, J. G. Micron-resolution velocimetry techniques. *Laser Techniques Applied to Fluid Mechanics*. Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 57-70.

MEINHART, Carl D.; WERELEY, Steve T.; SANTIAGO, Juan G. A PIV algorithm for estimating time-averaged velocity fields. *Journal of Fluids Engineering*, 2000b, vol. 122, no 2, p. 285-289.

MUSHFIQUE, Hasan, *et al.* 3D mapping of microfluidic flow in laboratory-on-a-chip structures using optical tweezers. *Analytical chemistry*, 2008, vol. 80, no 11, p. 4237-4240.

NEMET, Boaz A.; SHABTAI, Yossef; CRONIN-GOLOMB, Mark. Imaging microscopic viscosity with confocal scanning optical tweezers. *Optics letters*, 2002, vol. 27, no 4, p. 264-266.

NEMET, Boaz A.; CRONIN-GOLOMB, Mark. Microscopic flow measurements with optically trapped microprobes. *Optics letters*, 2002b, vol. 27, no 15, p. 1357-1359.

NEUMAN, Keir C.; BLOCK, Steven M. Optical trapping. *Review of scientific instruments*, 2004, vol. 75, no 9, p. 2787-2809.

NIEMINEN, Timo A., *et al.* Approximate and exact modeling of optical trapping. *SPIE NanoScience+ Engineering*. International Society for Optics and Photonics, 2010. p. 77622V1-77622V8.

OHMI, Kazuo; LI, Hang-Yu. Particle-tracking velocimetry with new algorithms. *Measurement Science and Technology*, 2000, vol. 11, no 6, p. 603.

OKAMOTO, K.; HASSAN, Y. A.; SCHMIDL, W. D. New tracking algorithm for particle image velocimetry. *Experiments in Fluids*, 1995, vol. 19, no 5, p. 342-347.

PESCE, G.; SASSO, A.; FUSCO, S. Viscosity measurements on micron-size scale using optical tweezers. *Review of scientific instruments*, 2005, vol. 76, no 11, p. 115105.

PETERMAN, Erwin JG; GITTES, Frederick; SCHMIDT, Christoph F. Laser-induced heating in optical traps. *Biophysical journal*, 2003, vol. 84, no 2, p. 1308-1316.

PRALLE, A., *et al.* Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microscopy research and technique*, 1999, vol. 44, no 5, p. 378-386.

PRESS, William H., *et al.* Numerical recipes in C: the art of scientific programming. *Section*, 1992, vol. 10, p. 408-412.

RAFFEL, Markus, *et al.* *Particle image velocimetry: a practical guide*. Springer, 2013.

ROHRBACH, Alexander; STELZER, Ernst HK. Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations. *Applied optics*, 2002, vol. 41, no 13, p. 2494-2507.

ROHRBACH, Alexander; STELZER, Ernst HK. Three-dimensional position detection of optically trapped dielectric particles. *Journal of Applied Physics*, 2002b, vol. 91, no 8, p. 5474-5488.

ROHRBACH, Alexander; KRESS, Holger; STELZER, Ernst HK. Three-dimensional tracking of small spheres in focused laser beams: influence of the detection angular aperture. *Optics letters*, 2003, vol. 28, no 6, p. 411-413.

ROHRBACH, Alexander. Stiffness of optical traps: quantitative agreement between experiment and electromagnetic theory. *Physical review letters*, 2005, vol. 95, no 16, p. 168102.

ROHRBACH, Alexander; STELZER, Ernst HK. Optical Trapping of Small Particles. En *Optical Imaging and Microscopy*. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 455-489.

SAMADI, Akbar; REIHANI, S. Nader S. Role of condenser iris in optical tweezer detection system. *Optics letters*, 2011, vol. 36, no 20, p. 4056-4058.

SANTANA-SOLANO, Jesús; RAMÍREZ-SAITO, Angeles; ARAUZ-LARA, José Luis. Short-time dynamics in quasi-two-dimensional colloidal suspensions. *Physical review letters*, 2005, vol. 95, no 19, p. 198301.

SATO, Yohei, *et al.* Spatially averaged time-resolved particle-tracking velocimetry in microspace considering Brownian motion of submicron fluorescent particles. *Experiments in Fluids*, 2003, vol. 35, no 2, p. 167-177.

STITOU, Adel; RIETHMULLER, M. L. Extension of PIV to super resolution using PTV. *Measurement Science and Technology*, 2001, vol. 12, no 9, p. 1398.

TAKEHARA, K.; ETOH, T. A study on particle identification in PTV particle mask correlation method. *Journal of Visualization*, 1998, vol. 1, no 3, p. 313-323.

TERRAY, Alex; OAKLEY, John; MARR, David WM. Microfluidic control using colloidal devices. *Science*, 2002, vol. 296, no 5574, p. 1841-1844.

TIEU, A. K.; MACKENZIE, M. R.; LI, E. B. Measurements in microscopic flow with a solid-state LDA. *Experiments in fluids*, 1995, vol. 19, no 4, p. 293-294.

TOLIĆ-NØRRELYKKE, Simon F., *et al.* Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane. *Review of scientific instruments*, 2006, vol. 77, no 10, p. 103101.

TOLIĆ-NØRRELYKKE, Iva Marija; BERG-SØRENSEN, Kirstine; FLYVBJERG, Henrik. MatLab program for precision calibration of optical tweezers. *Computer physics communications*, 2004, vol. 159, no 3, p. 225-240.

VERMEULEN, Karen C., *et al.* Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations. *Applied optics*, 2006, vol. 45, no 8, p. 1812-1819.



WAN, Jingfang, *et al.* Real-time in situ calibration of an optically trapped probing system. *Applied optics*, 2009, vol. 48, no 25, p. 4832-4841.

WERELEY, S. T.; GUI, L.; MEINHART, C. D. Advanced algorithms for microscale particle image velocimetry. *AIAA journal*, 2002, vol. 40, no 6, p. 1047-1055.

WOERDEMANN, Mike. *Structured Light Fields: Applications in Optical Trapping, Manipulation, and Organisation*. Springer Science & Business Media, 2012.

WU, Jing; DAY, Daniel; GU, Min. Shear stress mapping in microfluidic devices by optical tweezers. *Optics express*, 2010, vol. 18, no 8, p. 7611-7616.

YOSHIDA, Nobutoshi. Laser doppler velocimeter. *Handbook of Signal Processing in Acoustics*. Springer New York, 2008. p. 1329-1338.

ZHANG, Zh. *LDA Application Method Laser Doppler Anemometry for Fluid Dynamics*. Springer, Heidelberg, 2010.