



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas

Departamento de Física

Programa de Doctorado en Ciencias Físicas

**MEJORA EN LA RESOLUCIÓN ESPACIAL EN PINZAS  
ÓPTICAS DOBLES MEDIANTE USO DE  
CORRELACIONES ESPACIALES**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Físicas

Por:

Jorge Eduardo Tapia Farías

Profesor guía:

Dr. Carlos Saavedra Rubilar

Profesor co-guía:

Dr. Juan Pablo Staforelli Vivanco

agosto de 2020  
Concepción, Chile

# Comité evaluador :

## **Profesor guía**

Dr. Carlos Saavedra Rubilar  
Facultad de Ciencia Físicas y Matemáticas  
Departamento de Física  
Universidad de Concepción

## **Profesor co-guía**

Dr. Juan Pablo Staforelli Vivanco  
Facultad de Ciencia Físicas y Matemáticas  
Departamento de Física  
Universidad de Concepción

## **Evaluador interno**

Dr. Guillermo Rubilar Alegría  
Facultad de Ciencia Físicas y Matemáticas  
Departamento de Física  
Universidad de Concepción

## **Evaluador externo**

Dr. Esteban Vera Rojas  
Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería Eléctrica  
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

## **Director de programa**

Dr. Jaime Araneda Sepúlveda  
Facultad de Ciencia Físicas y Matemáticas  
Departamento de Física  
Universidad de Concepción

# Resumen

Los estudios biológicos plantean, en general, grandes desafíos de resolución espacio-temporales debido al tamaño, las dinámicas y las magnitudes propias de los sistemas bajo investigación. La resolución temporal de un instrumento estará relacionada con las frecuencias ópticas del fenómeno observado y la resolución espacial estará relacionada, generalmente, a la capacidad con que se pueden resolver pequeños desplazamientos de un sistema o de describir espacialmente un objeto. En este contexto, la arquitectura instrumental basada en pinzas ópticas surge como una alternativa para estudiar procesos biológicos con altos niveles de resolución y versatilidad. En relación a estos procesos, el uso de las pinzas ópticas puede ser concebido en dos regímenes de funcionamiento, en donde para ambos casos la interacción radiación-materia es fundamental. El primer caso es el de *pinzas ópticas de atrapamiento fuerte*. Este tipo de pinzas ha alcanzado un alto grado de sofisticación desde su implementación por primera vez en la década de los 70 por Arthur Ashkin, quien exploró los fenómenos de presión de radiación. La técnica consiste en un haz láser altamente enfocado en interacción con una micro-esfera, lo cual hace posible balancear fuerzas de presión de radiación con fuerzas de gradiente de intensidad. Esto genera fuerzas de restauración sobre el objeto que son proporcionales a su desplazamiento respecto al centro de la trampa. De esta manera, la técnica permite la manipulación de objetos microscópicos ( $\sim 500 \text{ nm} - 10 \mu\text{m}$ ) con alta precisión. Las capacidades de la técnica han sido probadas en contextos biológicos en donde dos micro-esferas atrapadas por pinzas ópticas se unen mediante un espécimen biológico. Esto ha permitido estimaciones de desplazamientos y fuerzas del sistema biológico en escalas de los sub-nanómetros y sub-pico Newton, respectivamente. Bajo la misma arquitectura instrumental, otra versión de estos sistemas son las *pinzas ópticas débiles*, las cuales, no están diseñadas para atrapar sino que para medir fluctuaciones de membranas lipídicas a partir de principios interferenciales. Este tipo de instrumentación es la utilizada en espectroscopía de fluctuación de membrana (TRMFS) con resolución espacial nanométrica. Basados en lo expuesto, el presente trabajo tuvo por objetivo implementar sistemas basados en pinzas ópticas dobles para medición diferencial en regímenes de potencia débil y fuerte. Su finalidad fue conseguir *evaluar mejoras en resolución de estos sistemas en cualquiera de los dos regímenes y, a la vez, obtener una herramienta que permita, potencialmente, estudiar fenómenos localizados en una membrana celular y proteína única*. Esto se fundamenta en el estado del arte conseguido en trabajos fundamentales de Betz et al. para membranas biológicas y Moffitt et al. para proteína única. Por lo anterior, se presenta de manera metodológica la implementación y caracterización progresiva de la instrumentación basada en pinzas ópticas y sus resultados. En específico, son mostrados los resultados de la implementación de una pinza óptica débil única y de una pinza óptica débil de doble haz basados en los trabajos de Betz et al. y, finalmente, los resultados asociados a un sistema de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte basados en los trabajos de Moffitt et al. y otros similares. Asociado a estos trabajos, se presentarán estudios complementarios de correlaciones de señales duales en sistemas de pinzas ópticas dobles para el análisis de posibles mejoras de la resolución espacial mediante el uso de coordenadas diferenciales.

# Agradecimientos

Los logros alcanzados por las personas no se pueden atribuir sólo al esfuerzo individual, sino que también al apoyo de un colectivo tanto familiar como profesional. Quisiera agradecer a mi esposa y familia por comprender el viaje que he realizado durante años en la búsqueda de conocimiento. Han sido el refugio para compartir mis alegrías y dificultades a través del camino. También quiero valorar el apoyo de mis amigos y del grupo académico de investigación del laboratorio de atrapamiento óptico y microscopía pues han tenido confianza en mi persona y me han dado su apoyo en la realización de esta tesis. Finalmente, agradezco el financiamiento de la beca de doctorado nacional CONICYT-PCHA/DoctoradoNacional/2016-21160093 para la realización de este trabajo.







*Dedicado a mi esposa y familia*

# Propuesta de investigación

A continuación se presenta la hipótesis y los objetivos generales y específicos para el presente trabajo, detallando en orden metodológico las tareas más relevantes a realizar.

## Hipótesis

Esquemas de pinzas ópticas dobles fuerte operando a potencias altas de atrapamiento, permiten la construcción de una coordenada diferencial de dos señales y reducida en ruido, comparativamente a las señales independientes correlacionadas. Luego, de forma general, es posible plantear que, si existe algún grado de correlación entre dos señales, entonces los esquemas de espectroscopía de fluctuación de membranas basados en esquemas de pinzas ópticas dobles de baja potencia, permiten la implementación de una coordenada diferencial que exhiba disminución de ruido y una consecuente mejora en la resolución espacial. Esto permitirá mostrar que, existiendo correlación de señales, se podrá definir siempre una coordenada diferencial y reducir el ruido en cualquiera de los regímenes de potencia utilizados, accediendo a nueva fenomenología de fluctuaciones.

## Objetivo general

Se desea implementar y caracterizar esquemas de pinzas ópticas únicas y dobles para su uso en régimen de potencia débil y atrapamiento fuerte. Estos dos regímenes permitirán medir fluctuaciones de membrana y atrapar esferas micrométricas, respectivamente. En ambas condiciones se puede construir un sistema de coordenadas diferenciales que hagan posible mejorar la resolución espacial y encontrar el origen de los movimientos con las correlaciones en los sistemas estudiados.

## Objetivos específicos

Los objetivos específicos están relacionados con tareas de diferentes ámbitos, desde programación hasta el diseño y montaje progresivo de sistemas basados en esquemas de atrapamiento óptico. El montaje y caracterización de los sistemas ópticos pueden ser divididos en dos etapas. La primera, es la implementación de dos sistemas en esquema de pinzas ópticas de potencia débil para la aplicación de la técnica TRMFS. Uno de ellos será de pinza única y el otro de pinzas doble. Debido a que ambos sistemas trabajan a baja potencia, se les denomina pinzas ópticas débiles. El objetivo de estas implementaciones es la medición de fluctuaciones de la membrana lipídica de glóbulos rojos (RBCs, por

sus siglas en inglés) con resoluciones espaciales nanométricas y sub-nanométricas cuando son expuestos a diferentes escenarios. Por su parte, la segunda etapa contempla la implementación de un sistema de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, es decir, dos pinzas ópticas trabajando a alta potencia de forma de atrapar dos partículas micrométricas de manera independiente y que permita una detección simultánea de sus posiciones. Los objetivos específicos de este trabajo son descritos abajo de manera metodológica.

En relación a la teoría:

1. Estudio teórico y conceptual de montaje de pinzas ópticas simples y dobles en sus regímenes de potencia débil para la detección de fluctuaciones de membrana. Esta técnica es denominada pinzas ópticas débiles para espectroscopía de fluctuaciones termales de membrana (TRMFS).
2. Estudio teórico y conceptual de montaje de pinzas ópticas dobles en sus regímenes de alta potencia para el atrapamiento independiente y detección simultánea de la posición de dos partículas micrométricas. Esta herramienta ha mostrado que el uso de una coordenada diferencial permite tomar ventaja de correlaciones de las posiciones de ambas esferas y mejorar las resoluciones espaciales. Esta técnica es denominada pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte.

En relación al diseño y programación:

1. Diseño y adquisición de óptica y optomecánica necesaria para montaje de pinza óptica simple y doble considerando las técnicas indicadas en el punto anterior.
2. Programación de algoritmo de adquisición única y simultánea mediante detectores de cuatro cuadrantes (QPDs) para montaje de sistemas de pinzas ópticas.
3. Programación de algoritmos para la aplicación de la técnica TRMFS relacionados a la calibración, extracción de fluctuaciones medias de membrana y al análisis de las densidades espectrales de potencia (PSDs) de estas señales para obtención de parámetros mecánicos.
4. Programación y estudio de algoritmos para la aplicación y el análisis en pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte relacionados al análisis de la densidad espectral de potencia (PSD) para determinación de frecuencias de corte, calibración de señales de desplazamiento y análisis de coordenada diferencial basado en correlaciones.

En relación al montaje:

1. Montar un sistema de pinza óptica débil en configuración de pinza única para aplicación de técnica TRMFS.

2. Montar un sistema de pinzas ópticas débiles en configuración de pinzas dobles para aplicación de técnica TRMFS.
3. Montar un sistema de pinzas ópticas en configuración de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte.

En relación a los resultados experimentales esperados:

1. Mediante el uso de una pinza óptica débil en configuración de pinza única para aplicación de técnica TRMFS: medir las fluctuaciones y parámetros mecánicos de la membrana de RBCs expuestos a diferentes concentraciones de resveratrol.
2. Mediante el uso de pinzas ópticas débiles en configuración de pinzas dobles para aplicación de técnica TRMFS: medir las fluctuaciones y parámetros mecánicos de la membrana de RBCs sanos expuestos a diferentes concentraciones de glucosa.
3. Mediante el uso pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte: caracterizar sistema mediante determinación de frecuencia de corte de cada trampa, obtener parámetro de conversión volt a nanómetros, calcular la constante de rigidez de cada trampa y determinar desplazamientos en nanómetros de las esferas atrapadas.
4. Usando TRMFS o pinzas ópticas de atrapamiento fuerte en sus configuraciones de doble haz: comparar los niveles de ruido de una señal diferencial con los de señales individuales mediante el uso del parámetro SNR (proporción señal a ruido), evaluando posibles mejoras de resolución espacial en el instrumento y su relación con las correlaciones en el sistema.

# Índice general

Resumen	III
Propuesta de investigación	VI
Hipótesis . . . . .	VI
Objetivo General . . . . .	VI
Objetivos Específicos . . . . .	VI
Índice general	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XVII
1. Introducción	1
2. Estado del arte	4
2.1. Pinzas ópticas: Teoría de atrapamiento óptico . . . . .	5
2.1.1. Descripción teórica de atrapamiento óptico en régimen de óptica geométrica $r \gg \lambda$ . . . . .	6
2.1.2. Descripción teórica de atrapamiento óptico en régimen de Rayleigh $r \ll \lambda$ . . . . .	8
2.1.3. Régimen intermedio $r \sim \lambda$ . . . . .	10
2.2. Densidad espectral de potencia para partículas confinadas mediante pinzas ópticas . . . . .	11
2.3. Tipos de ruido por origen físico en instrumentación con esquemas de pinzas ópticas . . . . .	13
2.3.1. Ruido cuántico de disparo . . . . .	13
2.3.2. Ruido mecánico y vibracional . . . . .	14
2.3.3. Ruido fundamental en pinzas ópticas: El movimiento browniano . . . . .	17
2.4. Conceptos acerca del SNR en señales . . . . .	18
2.5. Herramientas experimentales en biología basadas en esquemas de pinzas ópticas . . . . .	20
2.5.1. Escenarios biológicos para uso de esquemas de pinzas ópticas . . . . .	20
2.5.2. Pinzas ópticas para estudio de fluctuaciones de membranas: TRMFS	22



2.5.3.	Pinzas ópticas dobles acopladas: uso de correlaciones y sus ventajas	27
<b>3.</b>	<b>Experimentos implementados en biología</b>	<b>34</b>
3.1.	Conceptos experimentales previos	34
3.1.1.	Planos conjugados en implementación de pinzas ópticas	34
3.1.2.	Uso de planos conjugados para desplazamientos de haces en pinzas ópticas	37
3.1.3.	Interferometría de plano focal trasero: BFPI	39
3.1.4.	Fotodetectores de posición de cuatro cuadrantes: QPD	42
3.2.	TRMFS de pinza única: Estudio de los efectos antioxidantes del resveratrol sobre glóbulos rojos	44
3.3.	TRMFS de pinza doble: Estudio de los efectos de la glucosa sobre glóbulos rojos	51
3.4.	Pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte	59
<b>4.</b>	<b>Desarrollo experimental</b>	<b>68</b>
4.1.	Caracterización de láser y sus propiedades	69
4.1.1.	Caracterización de potencias de operación	70
4.2.	Interfaces de medición y adquisición de datos	71
4.2.1.	Interfaz de control y medición para TRMFS de haz único	71
4.2.2.	Interfaz de control y medición para TRMFS de doble haz	73
4.2.3.	Interfaz de control y medición para pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte	76
4.3.	Calibración del desplazamiento de los haces en el plano de la muestra (Test Target)	78
4.3.1.	Desplazamientos en el plano de la muestra de pinza única en TRMFS	79
4.3.2.	Desplazamientos en el plano de la muestra de pinzas dobles en TRMFS	80
4.3.3.	Desplazamientos en el plano de la muestra de pinzas dobles en régimen de atrapamiento fuerte	83
4.4.	Protocolos de preparación de muestras biológicas y objetos de atrapamiento	84
4.4.1.	Muestras de glóbulos rojos en TRMFS de pinza única: Efectos protectores del resveratrol en glóbulos rojos	85
4.4.2.	Muestras en TRMFS de pinzas dobles: Efectos de la glucosa en glóbulos rojos	88
4.4.3.	Muestras de esferas de poliestireno en pinzas ópticas dobles en régimen de atrapamiento fuerte	89
4.5.	Determinación de planos conjugados para fotodetectores de posición de cuatro cuadrantes QPD	90
4.6.	Experimentos basados en TRMFS: Curvas de calibración y medición	92
4.6.1.	TRMFS de haz único y efectos del resveratrol en glóbulos rojos: Curvas de calibración y medición de fluctuaciones	94
4.6.2.	TRMFS de doble haz y efectos de la glucosa en glóbulos rojos: Curvas de calibración y medición de fluctuaciones	98

4.7. Pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte: Factor de conversión y mediciones para su caracterización . . . . .	103
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>109</b>
5.1. TRMFS de pinza única en régimen de baja potencia y estudio de efectos protectores del resveratrol en membrana de glóbulos rojos . . . . .	109
5.1.1. Amplitudes de fluctuación y parámetros mecánicos . . . . .	109
5.2. Discusión de resultados para TRMFS de pinza única en régimen de baja potencia . . . . .	113
5.3. TRMFS de doble pinza en régimen de baja potencia y estudio de efectos de la glucosa sobre la membrana de glóbulos rojos . . . . .	114
5.3.1. Amplitudes de fluctuación y parámetros mecánicos . . . . .	114
5.3.2. Correlación de parámetros medios . . . . .	117
5.3.3. Correlación entre señales . . . . .	118
5.3.4. Determinación de la fluidez de membrana mediante polarización generalizada de Laurdan . . . . .	123
5.4. Evaluación de coordenada diferencial en TRMFS de doble pinza en régimen de baja potencia . . . . .	124
5.5. Discusión de resultados para TRMFS de doble pinza en régimen de baja potencia . . . . .	127
5.5.1. Relación de la fluctuación y parámetros mecánicos de los glóbulos rojos con respecto a la glucosa y el ATP . . . . .	127
5.5.2. Discusión de correlaciones . . . . .	130
5.5.3. Sobre las diferencias estadísticas de los haces de medición y polarización . . . . .	132
5.6. Discusión de uso de coordenada diferencial y SNR en TRMFS de doble pinza en régimen de baja potencia . . . . .	133
5.7. Pinzas ópticas dobles en régimen de alta potencia para atrapamiento fuerte	134
5.7.1. Caracterización de pinzas de atrapamiento fuerte y determinación de factor de conversión $\beta$ . . . . .	134
5.7.2. Conversión de señales de fluctuación y PSDs mediante uso de $\beta$ . . . . .	138
5.8. Discusión de resultados de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte . . . . .	143
<b>6. Conclusión</b>	<b>145</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>149</b>
<b>Apéndice</b>	<b>165</b>
<b>A. Valores <math>P</math> para correlaciones de Pearson</b>	<b>165</b>
<b>B. Imágenes de polarización generalizada de Laurdan</b>	<b>166</b>
B.1. Preparación de la muestra . . . . .	166
B.2. Adquisición de datos . . . . .	167
B.3. Análisis de datos de GP . . . . .	167

B.3.1. Determinación del tamaño de los glóbulos rojos . . . . . 167  
B.3.2. Determinación de la fluidez de membrana . . . . . 167





# Lista de figuras

2.1. Estabilidad axial de una esfera dieléctrica en un haz láser Gaussiano altamente enfocado por una lente. . . . .	7
2.2. Rigidez transversal de una trampa (dividido por la potencia local $P$ ) $\bar{\kappa}_{\perp}/P_{LO}$ en función del radio $r$ de la esfera atrapada para pinzas ópticas descritas a partir del régimen intermedio. . . . .	10
2.3. Diferentes esquemas para montaje de pinzas ópticas. . . . .	29
2.4. Montajes de pinzas ópticas única y dobles, unión de espécimen biológico a esferas atrapadas y ruidos asociados a este tipo de instrumentación. . . . .	31
2.5. Cálculo de SNR en pinzas ópticas dobles. . . . .	33
3.1. Esquema óptico para formación de planos conjugados. . . . .	35
3.2. Matriz de transferencia total $M_T$ de esquema óptico para formación de planos conjugados. . . . .	36
3.3. Uso de sistemas telescópicos en instrumentación basada en esquema de pinzas ópticas para el desplazamiento lateral de trampas en el plano de la muestra. . . . .	39
3.4. Esquema representativo de la técnica de interferometría de plano focal trasero (BFPI, por sus siglas en inglés). . . . .	41
3.5. Configuración de un fotosensor de posición de cuatro cuadrantes QPD y un haz infrarrojo IR incidiendo sobre su centro. . . . .	43
3.6. Esquema experimental propuesto para la medición de fluctuaciones de membranas lipídicas en glóbulos rojos mediante la técnica TRMFS. . . . .	46
3.7. Esquema experimental implementado para la medición de fluctuaciones en dos puntos de una membrana lipídica en glóbulos rojos mediante la técnica TRMFS de doble haz. . . . .	53
3.8. Esquema experimental implementado de pinzas ópticas dobles para detección mediante coordenadas diferenciales y uso de correlaciones. . . . .	61
4.1. Relación entre la corriente $C_{CONTROL}$ y la potencia real de salida del láser, $P_{LÁSER}$ . . . . .	70
4.2. Interfaz de control y adquisición de datos para calibración y medición en un sistema de TRMFS de haz único. . . . .	72
4.3. Interfaz de control y adquisición de datos para calibración y medición en un sistema de TRMFS de doble haz. Esta es utilizada para el estudio de los efectos de la glucosa en glóbulos rojos. . . . .	74

4.4.	Interfaz de control y adquisición de datos para calibración y medición en un sistema de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. Esta es utilizada para su calibración y caracterización. . . . .	77
4.5.	Objetivo de prueba (Test target) usado en determinación del tamaño de un pixel en unidades de longitud en el plano de la muestra. . . . .	79
4.6.	Desplazamiento del haz en el plano de la muestra para esquema de TRMFS de haz único. . . . .	80
4.7.	Desplazamiento de los haces $S_{ H\rangle}$ y $S_{ V\rangle}$ en el plano de la muestra para esquema de TRMFS de haz doble. . . . .	81
4.8.	Desplazamiento de los perfiles de intensidad de los haces $S_{ H\rangle}$ y $S_{ V\rangle}$ en el plano de la muestra para TRMFS de doble haz. . . . .	82
4.9.	Caracterización del desplazamiento de la trampa $S_{ V\rangle}$ en pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. . . . .	84
4.10.	Construcción de una cámara portamuestra para contener solución de glóbulos rojos incubados en resveratrol y otras soluciones para TRMFS de haz único. . . . .	86
4.11.	Construcción de una cámara portamuestra para contener solución de glóbulos rojos incubados en D-glucosa para TRMFS de doble haz. . . . .	89
4.12.	Determinación general del plano conjugado del plano focal trasero de lente colector en esquemas de pinzas ópticas. . . . .	91
4.13.	Curva de calibración en implementaciones de TRMFS, tanto para haz único como doble. . . . .	93
4.14.	Proceso de obtención de curva de calibración para implementación de TRMFS de haz único. . . . .	96
4.15.	Ajuste del modelo de membrana sobre la PSD promedio de la membrana de un glóbulo rojo extraída desde sus fluctuaciones bajo una condición en particular para TRMFS de una pinza. . . . .	98
4.16.	Procedimiento de obtención de las curvas de calibración para la implementación de TRMFS de dos haces ortogonales. . . . .	100
4.17.	Ajuste del modelo de membrana a la PSD promedio extraída desde las fluctuaciones de membrana de un glóbulo rojo sometido a una concentración de D-glucosa en particular. . . . .	102
4.18.	Procedimiento y herramientas para la calibración en pinza ópticas dobles de atrapamiento fuerte. . . . .	106
5.1.	Valores de STD que representan la fluctuación promedio de los glóbulos rojos para cuatro condiciones distintas en estudio de efectos protectores del resveratrol. . . . .	111
5.2.	Amplitudes de fluctuación y determinación de parámetros mecánicos de glóbulos rojos expuestos a diferentes concentraciones de D-glucosa (5.5, 12.5 y 25 mM) para el estudio de los efectos de la glucosa sobre las fluctuaciones de membrana. . . . .	115

5.3. Valores de tensión $\sigma$ promedio de cada uno de los $N$ glóbulos medidos a una concentración de 25 mM de D-glucosa son mostrados simultáneamente para los haces de medición $S_{ V\rangle}$ y $S_{ H\rangle}$ . . . . .	118
5.4. Valores promedio de la correlación de Pearson entre señales $S_{ V\rangle}$ y $S_{ H\rangle}$ para glóbulos rojos a diferentes concentraciones de D-glucosa. . . . .	119
5.5. Señales de Amplitud de fluctuación $S_{ V\rangle}$ (Azul) y $S_{ H\rangle}$ (Verde) de 10 segundos para concentraciones de 5.5 ( <b>A</b> ), 12.5 ( <b>B</b> ) y 25 mM ( <b>C</b> ) de D-glucosa con valores de anticorrelación de -0.38, -0.46 y -0.40. . . . .	121
5.6. Correlaciones cruzadas entre señales $S_{ V\rangle}$ y $S_{ H\rangle}$ de dos glóbulos independientes para las concentraciones de 5.5 ( <b>A</b> ), 12.5 ( <b>B</b> ) y 25 ( <b>C</b> ) mM. . . . .	122
5.7. Medición de la fluidez de membrana mediante método Laurdan-GP. . . . .	124
5.8. Análisis del SNR de las señales individuales de medición $S_{ H\rangle}$ y $S_{ V\rangle}$ , y de la señal diferencial $S_{ diff\rangle}$ extraída desde ambas. . . . .	126
5.9. Interpretaciones de posibles movimientos de los glóbulos rojos asociados a los resultados de anticorrelación de Pearson. . . . .	131
5.10. PSDs en unidades arbitrarias para señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 0 \mu\text{m}$ . . . . .	136
5.11. PSDs en unidades arbitrarias para señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 2.85 \mu\text{m}$ . . . . .	136
5.12. PSDs en unidades arbitrarias para señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 5.71 \mu\text{m}$ . . . . .	137
5.13. PSDs en unidades arbitrarias para señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 11.42 \mu\text{m}$ . . . . .	137
5.14. Señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) convertidas a nanómetros (nm) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 0 \mu\text{m}$ . . . . .	139
5.15. Señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) convertidas a nanómetros (nm) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 2.85 \mu\text{m}$ . . . . .	139
5.16. Señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) convertidas a nanómetros (nm) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 5.71 \mu\text{m}$ . . . . .	140
5.17. Señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) convertidas a nanómetros (nm) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 11.42 \mu\text{m}$ . . . . .	140
5.18. PSDs en unidades de $\text{nm}^2/\text{Hz}$ para señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 0 \mu\text{m}$ . . . . .	141

5.19. PSDs en unidades de $\text{nm}^2/\text{Hz}$ para señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 2.85 \mu\text{m}$ . . . . .	141
5.20. PSDs en unidades de $\text{nm}^2/\text{Hz}$ para señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 5.71 \mu\text{m}$ . . . . .	142
5.21. PSDs en unidades de $\text{nm}^2/\text{Hz}$ para señales de posición X e Y de esferas en trampas $S_{ H\rangle}$ ( <b>A</b> (eje X) y <b>B</b> (eje Y)) y $S_{ V\rangle}$ ( <b>C</b> (eje X) y <b>D</b> (eje Y)) cuando estas están separadas por un $\Delta X = 11.42 \mu\text{m}$ . . . . .	142



# Lista de tablas

2.1.	Degradación de las mediciones por efecto de vibraciones mecánicas en diferentes contextos y sistemas. . . . .	15
2.2.	Frecuencias asociadas a diferentes fuentes de vibraciones mecánicas. . . . .	16
2.3.	Tabla comparativa entre diferente instrumentación para medir desplazamientos y fuerzas en sistemas biológicos. . . . .	21
2.4.	Estudios realizados mediante instrumentación basada en esquemas de pinzas ópticas y las magnitudes características medidas que describen los procesos de estudio. . . . .	22
4.1.	Principales características del láser utilizado para la operación en experimentos basados en TRMFS y pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. . . . .	69
5.1.	Tabla comparativa de fluctuaciones de glóbulos rojos sanos en condición control obtenidas en diferentes trabajos. . . . .	110
5.2.	Parámetros mecánicos de los glóbulos rojos para diferentes condiciones a los que fueron expuestos en estudio de los efectos protectores del resveratrol. . . . .	113
5.3.	Comparación de los promedios de fluctuaciones y parámetros mecánicos para los haces de medición $S_{ V)}$ y $S_{ H)}$ en tres concentraciones de D-glucosa. . . . .	116
5.4.	Valores $P$ obtenidos mediante test ANOVA para el análisis estadístico de las fluctuaciones y parámetros mecánicos de glóbulos rojos expuestos a diferentes condiciones de D-glucosa. . . . .	117
5.5.	Correlación de Pearson entre los parámetros medios de la membrana (Amplitud de fluctuación, $\kappa$ y $\sigma$ ) obtenidos para $S_{ V)}$ y $S_{ H)}$ para cada concentración de D-glucosa. . . . .	117
5.6.	Valores de correlación de Pearson promedio entre señales $S_{ V)}$ y $S_{ H)}$ para diferentes concentraciones de D-glucosa usando ventanas temporales de análisis de 0.01, 0.1, 1 y 10 segundos equivalentes a frecuencias de análisis de 100, 10, 1 y 0.1 Hz, respectivamente. . . . .	120
5.7.	Tabla resumen con los valores de caracterización de las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. . . . .	138
5.8.	Resumen de los valores de desplazamiento de las esferas dentro de las trampas respecto al centro de estas en unidades de nanómetro para pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte . . . . .	143

A.1. Valores  $P$  de las correlaciones de Pearson obtenidos para las concentraciones 5.5, 12.5 y 25 mM de D-glucosa utilizando diferentes ventanas de tiempo para las señales analizadas. . . . . 165



# Capítulo 1

## Introducción

En las últimas décadas, las técnicas de micromanipulación han alcanzado un alto grado de sofisticación desde los trabajos preliminares realizados por Arthur Ashkin y su grupo de investigación, en los cuales exploraron el fenómeno de la presión de radiación en esferas de poliestireno mediante el uso de un haz láser de onda continua con una distribución de intensidad Gaussiana [1,2]. Es a partir de estos trabajos que ha surgido la técnica denominada **pinzas ópticas**, la que puede proveer una forma directa pero no invasiva de explorar complejos celulares (como glóbulos rojos), y macromoleculares (como enzimas, proteínas y motores moleculares) a partir de la manipulación y caracterización de fuerzas en objetos y sistemas de tamaño microscópico [3,4]. Es así que ésta se ha convertido en una herramienta poderosa y versátil en el campo de la Biología. En general, la técnica está enfocada en la manipulación, control y registro de alta resolución dentro del rango desde 0.1 Hz hasta los 100 kHz, rango en el cual se describen un sinnúmero de fenómenos de importancia físico-química fundamentales para la Biología. El funcionamiento de esta herramienta consiste de un haz láser altamente enfocado, donde fuerzas de presión de radiación son balanceadas mediante las fuerzas de gradiente de intensidad las cuales generan un pozo de potencial tipo armónico donde partículas microscópicas pueden ser atrapadas. En el régimen lineal de fuerzas de atrapamiento, la fuerza restauradora es proporcional al desplazamiento de la esfera atrapada desde el centro de la trampa. Las pinzas ópticas pueden proveer adquisición de datos dinámicos, estimación de distancias sub-nanométricas y manipulación de objetos en el orden de partículas desde los micrómetros hasta la escala atómica. Basados en estos principios, grandes esfuerzos de investigación e ingeniería han sido dirigidos hacia el desarrollo de diversas técnicas basadas en la aplicación de las pinzas ópticas y, mediante estrategias correctas de operación, se han podido realizar una amplia variedad de aplicaciones en sistemas biológicos tales como células, bacterias y motores moleculares [5,6]. En relación a lo anterior, existen diversos ejemplos de avances en la caracterización de sistemas que van desde las escalas atómicas a las celulares. A escala atómica, importantes mejoras en técnicas de pinzas ópticas han permitido el atrapamiento de átomos, así como también el enfriamiento de iones individuales y generación de condensados [7]. De este modo, la termodinámica de sistemas individuales pequeños se ha convertido en un campo de investigación intensiva en nuestros días, abarcando desde el régimen cuántico hasta el movimiento browniano y la complementación entre ambas aproximaciones [8]. En

particular, la posibilidad de ejercer control en la distribución de posiciones de un micro-sistema ha llevado a nuevos conocimientos sobre procesos microtermodinámicos ruidosos, tales como micromáquinas, moléculas únicas, MEMS, manipulación óptica, entre muchas otras [9]. Configuraciones experimentales específicas basadas en los principios anteriormente mencionados, han sido implementados con el fin de optimizar las capacidades resolutivas espaciales. Para lograrlo, se han implementado esquemas de pinzas ópticas duales [5] en donde una de sus versiones más relevantes y sofisticadas es la de *pinzas ópticas dobles con uso de señales diferenciales* extraídas a partir de dos trampas [5, 10–16]. Esta estrategia permite obtener resoluciones espaciales sub-nanométricas y medición de fuerzas de sistemas biológicos en la escala de los sub-pico Newton. Dadas las capacidades resolutivas y el grado de sofisticación de estos sistemas las pinzas ópticas se han convertido también en una herramienta extremadamente usada en el campo de molécula única. Grandes avances en la estimación cuantitativa de fuerzas de femto-Newton mediante el uso de esta herramienta han permitido una mejora trascendental en nuestra comprensión de procesos biológicos sub-celulares [17].

Otras variaciones en la estrategia de medida basados en esquemas experimentales de pinzas ópticas han permitido el desarrollo de técnicas que permiten el estudio de la dinámica de los RBCs a partir de sus fluctuaciones de membrana lipídica y propiedades tanto mecánicas como viscoelásticas [18–46]. Una de las más relevantes y que es tratada en este trabajo, es la técnica de *espectroscopía de fluctuaciones termales de membrana* (TRMFS, por sus siglas en inglés) la cual ha sido implementada para la medición en tiempo real de las fluctuaciones de membranas lipídicas en RBCs [31, 39, 44, 47] como también de neuritas [48, 49]. El método TRMFS se basa en una técnica de interferometría [31, 39, 50] que fue introducida recientemente en el contexto de la membrana de los glóbulos rojos. La configuración experimental es equivalente a las pinzas ópticas, pero opera en un modo de detección de fluctuaciones a intensidades del láser que se encuentran en un orden de magnitud por debajo del régimen de atrapamiento. El método experimental es fácilmente reproducible en cualquier configuración de pinzas ópticas equipada con un fotodiodo de posición de cuatro cuadrantes el cual permite la observación de fluctuaciones de membranas lipídicas bicapa y el cálculo de la densidad espectral de potencia en regímenes de frecuencias de 0.1 Hz – 1000 Hz [31, 39], lo cual permite acceder mediante un modelo de membrana bilipídica [31, 39, 44] a los parámetros mecánicos de la membrana tales como el módulo de flexión  $\kappa$  y la tensión  $\sigma$ . A partir de esta configuración y método, es posible acceder típicamente a resoluciones espaciales del orden de los nanómetros y resoluciones temporales dentro del rango  $10^{-4} - 10^{-5}$  s (considerando teorema de muestreo de Nyquist y adquisición de datos típica a tasas de 100 o 200 kHz) aún cuando parte de la literatura menciona capacidades resolutivas incluso superiores [31, 39, 47].

Desde una perspectiva histórica, es importante enfatizar que la tecnología de microscopios es el resultado de un esfuerzo conjunto de una gran comunidad de científicos y científicas. Algunos de los más destacados son Frederick Zernike, ganador del premio Nobel por el microscopio de contraste de fase interferencial en 1953 [51–56], Stefan W. Hell y su grupo de investigación [57], premio Nobel 2014 por su contribución a la microscopía



STED y Arthur Ashkin, desarrollador de la técnica de atrapamiento óptico y galardonado con el premio Harvey en 2004 y el premio Nobel de Física en 2018. Estos logros y reconocimientos resaltan cuán importante es explorar nuevas posibilidades por mejorar la tecnología de microscopios ópticos. Estas contribuciones han generado una nueva perspectiva para la investigación en la escala sub-micrométrica, donde aún desconocemos los mecanismos de funcionamiento claves para la comprensión de la biología a estas escalas.

Es por lo anterior que aquí proponemos montar y caracterizar sistemas de pinzas ópticas dobles para medición diferencial mediante una metodología de implementación progresiva de técnicas basadas en pinzas ópticas. En este trabajo, la propuesta principal es lograr obtener una herramienta que permita alcanzar mayor resolución espacial comparada a un sistema simple no acoplado, con el fin de caracterizar desplazamientos del orden de las decenas de nanómetros o inferior. La configuración experimental propuesta consiste en un sistema en donde dos puntos de medición están unidos por un ligando biológico, tal como podrían ser dos puntos de medición sobre un glóbulo rojo unidos por su membrana o dos microesferas atrapadas por pinzas ópticas unidas por una cadena molecular (proteína o ADN). Lo anterior permite, mediante las señales obtenidas en ambos puntos de medición, hacer un análisis de correlación de datos para cuantificar el acoplamiento del sistema (haz de medición 1-ligando biológico-haz de medición 2). Para este propósito, serán implementados sistemas de pinzas ópticas dobles con un sistema de adquisición de alta velocidad, basado en fotodetectores de cuatro cuadrantes (QPD) que cuentan con una frecuencia de registro de hasta 100 kHz. Lo anterior permitirá alta sensibilidad temporal y posibles mejoras en la resolución espacial, pudiéndose llegar potencialmente a la escala sub-nanométrica. A partir del desarrollo de estos sistemas, se pretende estudiar, mediante correlaciones y análisis diferencial de datos, los mecanismos de acoplamiento de ciertos ligandos biológicos, tales como membranas de glóbulos rojos (RBC) o cadenas de ADN. Los análisis mediante coordenadas diferenciales de las señales se espera que permitan una mejora en la resolución espacial en comparación a una detección directa no-diferencial. Como escenario de aplicación particular, se espera someter estos ligandos a condiciones de estrés químico y óptico que puedan rigidizar o relajar su constante de elasticidad, tales como ácidos en solución (ácido hipocloroso, HClO) o radiación UV, para así estudiar mecanismos de acoplamientos de tipo armónicos o anarmónicos en función de la rigidez del ligando.

# Capítulo 2

## Estado del arte

Los comienzos del principio de atrapamiento óptico se encuentran en el trabajo de Arthur Ashkin, el cual demostró que la fuerza de radiación de un láser altamente enfocado afectaba considerablemente la dinámica de partículas de tamaño microscópico suspendidas en agua [1]. La primera trampa óptica estable fue generada por Ashkin en la mitad de la década de los 80 [2]. Para ello, utilizó un haz altamente enfocado usando un lente objetivo de microscopio. De esta forma, pudo hacer divergir el haz rápidamente desde el foco y logró atrapar de manera estable micropartículas bajo los  $10\ \mu\text{m}$ . El principio físico subyacente a este fenómeno está ligado a la existencia de fuerzas de gradiente en dirección del gradiente de intensidad del haz láser y a las fuerzas dispersivas en la dirección de la propagación del haz. Este fenómeno es explicado para diferentes regímenes de tamaños de microesferas de manera detallada en este capítulo. Además de revisar el principio básico de funcionamiento del atrapamiento óptico, también consideraremos conceptos relacionados a la detección en sistemas que estudian procesos biológicos y los ruidos a los que este tipo de mediciones se ven enfrentadas, dado que los métodos de detección definirán la sensibilidad de las mediciones realizadas. En particular, la medición de la posición de una sonda adherida al sistema biológico a estudiar y la resolución con que lo hagamos es crucial para inferir la dinámica que deseamos observar. Existen múltiples métodos de detección de posición usados para el estudio de la dinámica de sistemas biológicos, tanto para pinzas ópticas como en el uso de otras técnicas. Por ejemplo, se ha reportado el uso de diferentes transductores mecánicos para la detección de posición en estudios de desplegamiento de proteínas, motilidad celular y desplegamiento de hebras de ADN, en donde se han usado cantilevers y microagujas como sensores, entre otros [58–62]. Si ahora pensamos en un contexto en donde son usadas las pinzas ópticas, la acción de microsistemas como la kinesina desplazándose sobre un microtúbulo, el despliegue de una hebra de ARN o el empaquetamiento del ADN de un virus realizado por un motor molecular, se monitorea a partir de la detección del movimiento de microesferas que se encuentran atrapadas en un pozo potencial y que están adheridas a estos microsistemas biológicos. Típicamente, en este tipo de sistemas son utilizados métodos interferométricos de detección que usan fotodetectores de posición de cuatro cuadrantes como también videomicroscopía mediante el cual se realiza el seguimiento de la posición del centroide de la imagen de la microesfera atrapada [4, 58–72]. Por lo tanto, las microesferas no solo sirven como manijas sino

también como sondas en donde mediante la detección de sus movimientos podemos inferir desplazamientos y fuerzas de los sistemas a los cuales están adheridos [5]. La sensibilidad con que se detecta la posición de la microesfera será la característica clave al trabajar con pinzas ópticas y estará determinada por el tipo de sensor usado, la arquitectura del sistema óptico y la estrategia de procesamiento de datos.

En definitiva, múltiples métodos de detección de posición han sido implementados y descritos en la literatura para el estudio de microsistemas biológicos, en donde las señales son adquiridas generalmente desde transductores mecánicos y seguimientos de centroides mediante videomicroscopía y fotodetectores. Sin embargo, independiente de cómo son adquiridas las señales de posición, todos los métodos apuntan a mejorar la resolución espacial debido a que todas las señales se enfrentan a desafíos de ruidos intrínsecos en este tipo de mediciones tales como el ruido browniano o térmico, ruidos electrónicos y ruidos cuánticos [5, 71, 73–76]. Los efectos de estos ruidos limitan la resolución espacial con que se determinan las posiciones, y por lo tanto las estimaciones de fuerzas de los sistemas biológicos estudiados. Nos centraremos entonces en describir los problemas de ruidos en señales de posición y los factores que permiten evaluar la resolución espacial, principalmente, en sistemas que estudian sistemas biológicos ligados a la utilización de pinzas ópticas, tema del cual trata el actual trabajo. En este tipo de sistemas uno de los factores comúnmente usados para esta evaluación es el parámetro denominado proporción señal-ruido (SNR, por sus siglas en inglés) el cual no es más que la proporción entre la señal o tamaño de un desplazamiento y el ruido que puede obscurecer esta medida [5]. Finalmente, se tratarán los desafíos experimentales enfrentados en esta tesis relacionados con la implementación de técnicas de detección de posición basadas en esquemas de pinzas ópticas que permiten alcanzar resoluciones espaciales nanométricas e incluso sub-nanométricas. Entre estas técnicas, se describirá la implementación de un sistema de detección de fluctuaciones de membrana denominada TRMFS en sus modalidades de pinza única y doble, y finalmente, se describirá la técnica de pinzas ópticas dobles diferenciales de atrapamiento fuerte que permiten potencialmente alcanzar resoluciones sub-nanométricas.

## 2.1. Pinzas ópticas: Teoría de atrapamiento óptico

Las pinzas ópticas basan su principio de funcionamiento en la fuerza que ejerce la luz al interactuar sobre la materia, la cual es producida por los fenómenos de reflexión, refracción, absorción y dispersión de la luz en presencia de un cambio de índice de refracción  $n$  [1, 2, 77, 78]. Para entender el fenómeno, consideremos la interacción de un haz láser altamente enfocado por un lente sobre una partícula dieléctrica. Aquí, la luz incide sobre la partícula, produciendo transferencia de momentum y generando un desplazamiento en el sentido de propagación de la luz, lo cual es denominado *fuerza de scattering*. Esta es proporcional a la intensidad del haz incidente. Por su parte, el gradiente de intensidad, producido por el efecto de reducir el ancho del perfil laser al enfocar el haz, genera una fuerza transversal y opuesta al sentido de propagación, en dirección a la región focal donde la intensidad del campo electromagnético es mayor. Lo anterior, produce como

consecuencia el desplazamiento de la partícula hacia ese punto. Esta fuerza es denominada *fuerza de gradiente* y es proporcional al gradiente de intensidad y a la polarizabilidad de la partícula dieléctrica. Finalmente, el confinamiento de las partículas debido a la luz es debido al equilibrio de fuerzas de scattering y de fuerzas de gradiente. Una vez que la partícula es atrapada, la fuerza restauradora  $F$  que sufre la partícula cuando es desplazada de la posición de equilibrio, o centro de la trampa óptica, se puede determinar mediante la ecuación [78]

$$F = Q \left( \frac{n_m P_L}{c} \right). \quad (2.1)$$

La ecuación 2.1 nos entrega la relación que existe entre la fuerza restauradora de la trampa óptica sobre una esfera dieléctrica y la potencia del haz láser. En esta ecuación,  $Q$  es un factor de proporcionalidad que puede ser interpretado como un parámetro de eficiencia adimensional,  $n_m$  es el índice de refracción del medio que rodea la esfera,  $P_L$  la potencia del láser y  $c$  la velocidad de la luz en el espacio libre. Para valores típicos, la fuerza restauradora es del orden de los pico-Newton. Para la descripción completa del fenómeno, debemos saber en qué régimen óptico está sucediendo el fenómeno, es decir, en el régimen de óptica geométrica, de Rayleigh o en un régimen intermedio. El régimen de óptica geométrica es un acercamiento al fenómeno a partir de la óptica de rayos, es decir, cuando el radio  $r$  de la esfera cumple  $r \gg \lambda$ , en donde  $\lambda$  es la longitud de onda del láser de atrapamiento. Por su parte, si estamos trabajando en el régimen de Rayleigh, implica que el radio  $r$  de la esfera cumple  $r \ll \lambda$ . Finalmente, un régimen intermedio considerará los efectos de tratar con la condición en que  $r \sim \lambda$ . A continuación, es presentado el acercamiento de cada uno de estos regímenes al fenómeno del atrapamiento óptico.

### 2.1.1. Descripción teórica de atrapamiento óptico en régimen de óptica geométrica $r \gg \lambda$

En general, las partículas usadas para el atrapamiento en sistemas de pinzas ópticas son dieléctricas y poseen un índice de refracción mayor al del medio que las circunda. Si consideramos este tipo de partículas como esféricas en donde su radio  $r$  cumple con  $r \gg \lambda$ , podemos describir el atrapamiento óptico mediante la transferencia de momentum lineal asociada al cambio de trayectoria de los rayos producto de la refracción, reflexión y transmisión al incidir sobre la esfera dieléctrica.

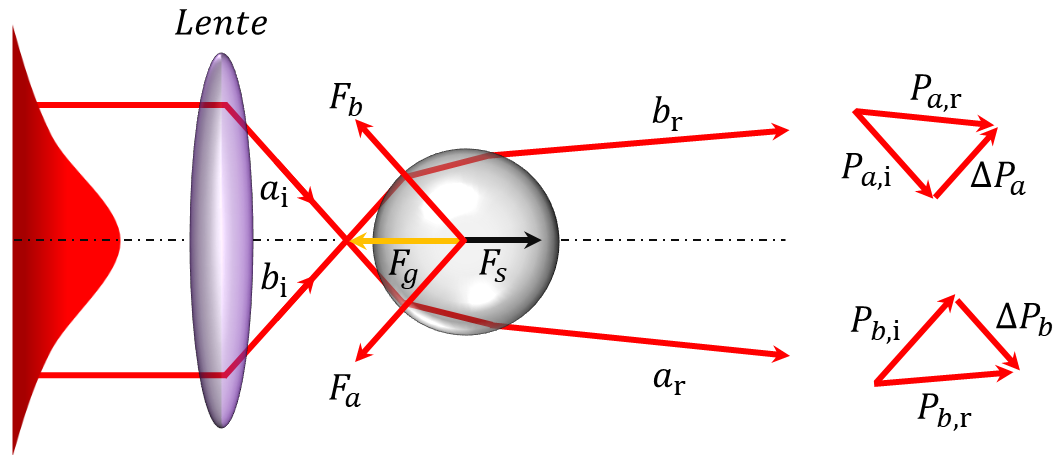


Figura 2.1: Estabilidad axial de una esfera dieléctrica en un haz láser Gaussiano altamente enfocado por una lente. Considere que los subíndices *i* y *r* denotan incidencia y refracción, respectivamente. El rayo  $a_i$  con momentum  $P_{a,i}$  y el rayo  $b_i$  con momentum  $P_{b,i}$ , son enfocados por una lente y refractados al incidir sobre una esfera dieléctrica. Los rayos  $a_r$  de momentum  $P_{a,r}$  y  $b_r$  de momentum  $P_{b,r}$ , corresponden a la refracción de  $a_i$  y  $b_i$ , respectivamente. El cambio de momentum  $\Delta P_a$  de  $a_i$  y  $\Delta P_b$  para  $b_i$ , generan las fuerzas de reacción  $F_a$  y  $F_b$  que dan como resultado una fuerza de gradiente  $F_g$  que compensa la fuerza de dispersión (scattering)  $F_s$  (por reflexión) y la fuerza peso de la esfera. De esta manera,  $F_g$  produce el atrapamiento óptico estable de la esfera. Fuente de imagen: elaboración propia.

El confinamiento óptico estable se consigue enfocando fuertemente un haz láser de manera simétrica enfrente de una esfera dieléctrica. Tomando como referencia el esquema de la figura 2.1, el rayo  $a_i$  de momentum inicial  $P_{a,i}$ , sufre un cambio de momentum debido a la refracción cuando es transmitido por la esfera, emergiendo desde esta como lo indica el rayo  $a_r$  con momentum final  $P_{a,r}$ . De esta manera, el rayo incidente  $a_i$  sufre un cambio  $\Delta P_a$  en su momentum, el cual, por la segunda ley de Newton ( $\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt}$ ), tiene asociada una fuerza. Esta fuerza es la aplicada por el objeto refractivo (la esfera dieléctrica) sobre el rayo  $a_i$  para producir su desviación. Por conservación del momentum lineal y la tercera ley de Newton, la esfera experimenta el mismo cambio de momentum que la luz pero en sentido opuesto y, por lo tanto, existirá una fuerza de reacción  $F_a$  de la luz sobre la esfera. Este hecho implica que la interacción radiación-partícula produce transferencia de momentum desde el rayo de luz a la partícula. El mismo análisis anterior se realiza para el rayo  $b_i$  tomando en consideración la simetría de su incidencia sobre la esfera. De esta manera, los rayos  $a_i$  y  $b_i$  producen fuerzas  $F_a$  y  $F_b$ , respectivamente, en sentido opuesto al cambio de momentum experimentado por cada uno de ellos. Considerando que las fuerzas  $F_a$  y  $F_b$  son simétricas y de igual magnitud, la suma de ambas dará como resultado una fuerza de gradiente  $F_g$  dirigida en sentido opuesto a la propagación del haz incidente en el eje axial. Esta fuerza  $F_g$  compensará la fuerza de dispersión (scattering)  $F_s$  debido a la reflexión de

los rayos incidentes sobre la esfera y a la fuerza de peso de esta última (los rayos reflejados y la fuerza peso no se indican en la figura por simplicidad) [77]. De este modo, se tendrá una esfera atrapada de manera estable, generándose el atrapamiento óptico.

### 2.1.2. Descripción teórica de atrapamiento óptico en régimen de Rayleigh $r \ll \lambda$

Bajo este régimen, la partícula es tratada como un pequeño dipolo eléctrico en presencia de un campo electromagnético (CEM), por lo que la descripción de la fuerza óptica que sufre la partícula puede obtenerse utilizando las ecuaciones electromagnéticas. Cuando se realizó el análisis geométrico de un haz incidiendo sobre una partícula, se obtuvieron dos componentes asociadas a la fuerza que experimenta la partícula bajo la interacción de la luz, las cuales corresponden a la fuerza de gradiente y de scattering. Considerando la aproximación dipolar, el primer término asociado a la fuerza de gradiente es debido a la fuerza de Lorentz que actúa sobre el dipolo inducido, mientras que el término asociado a la fuerza de dispersión o scattering es producto de la absorción y radiación de la luz por parte del dipolo (cambio de momentum). En la aproximación dipolar, la fuerza de Lorentz para una partícula en presencia de un campo electromagnético es [79]

$$\mathbf{F} = (\mathbf{p} \cdot \nabla) \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{p}}{\partial t} \times \mathbf{B}, \quad (2.2)$$

en donde  $\mathbf{E}$  y  $\mathbf{B}$  denotan al campo eléctrico y magnético respectivamente, y  $\mathbf{p}$  es el momento dipolar inducido, el cual se encuentra relacionado con el campo eléctrico y la polarizabilidad de la partícula mediante la expresión  $\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E}$ . Para esta última expresión, se tiene  $\alpha = 4\pi n_m^2 \varepsilon_0 a^3 (m^2 - 1) / (m^2 + 2)$ , en donde  $m = n_e / n_m$  es el índice de refracción relativo,  $n_e$  y  $n_m$  índices de refracción de la esfera y el medio circundante, respectivamente,  $\varepsilon_0$  constante dieléctrica del vacío y  $a$  el radio de la esfera. A partir de la relación del momento dipolar inducido, la ecuación 2.2 queda expresada como

$$\begin{aligned} \mathbf{F} &= (\alpha \mathbf{E} \cdot \nabla) \mathbf{E} + \frac{\partial (\alpha \mathbf{E})}{\partial t} \times \mathbf{B} \\ &= \alpha \left\{ (\mathbf{E} \cdot \nabla) \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \times \mathbf{B} \right\}. \end{aligned} \quad (2.3)$$

El primer término asociado al campo eléctrico en la ecuación 2.3, puede ser reescrito mediante el uso de la siguiente identidad:

$$(\mathbf{A} \cdot \nabla) \mathbf{A} = \nabla \left( \frac{A^2}{2} \right) - \mathbf{A} \times (\nabla \times \mathbf{A}). \quad (2.4)$$

De esta manera, se puede reescribir la ecuación 2.2 de la forma

$$\mathbf{F} = \alpha \left\{ \nabla \left( \frac{E^2}{2} \right) - \mathbf{E} \times (\nabla \times \mathbf{E}) + \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \times \mathbf{B} \right\}. \quad (2.5)$$

Ahora, considerando la ley de Faraday,  $\nabla \times \mathbf{E} = -\partial \mathbf{B} / \partial t$ , es posible reescribir la ecuación 2.5 y obtener de manera reducida la expresión de la fuerza de Lorentz que incluye un término asociado al gradiente de intensidad y otro asociado al vector de Poynting como se expresa en

$$\begin{aligned} \mathbf{F} &= \alpha \left\{ \nabla \left( \frac{E^2}{2} \right) - \mathbf{E} \times \left( -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \right) + \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \times \mathbf{B} \right\} \\ &= \alpha \left\{ \frac{1}{2} \nabla E^2 + \frac{\partial}{\partial t} (\mathbf{E} \times \mathbf{B}) \right\}. \end{aligned} \quad (2.6)$$

Si se considera que la partícula se encuentra bajo la influencia de un láser de onda continua (CW), se tendrá que el término asociado al vector de Poynting se anula (no hay variación de potencia en el tiempo), así, el promedio temporal de la fuerza da como resultado la ecuación

$$\langle \mathbf{F} \rangle = \frac{\alpha}{2} \langle \nabla E^2 \rangle. \quad (2.7)$$

La expresión de 2.7 corresponde a la fuerza de gradiente [2, 79]

$$\mathbf{F}_g = \frac{\alpha}{2n_m \varepsilon_0 c} \nabla I, \quad (2.8)$$

en donde  $I$  es la intensidad del láser. Podemos ver entonces que la fuerza aplicada es proporcional al gradiente de intensidad del haz.

Ahora, de la interacción CEM-dipolo, en donde el dipolo absorbe y reemite radiación, se tendrá como resultado la transferencia de momentum y fuerza de dispersión o scattering sobre la partícula. Dada la intensidad del láser como  $I_0$ ,  $\sigma$  como la sección diferencial de scattering,  $n_m$  el índice de refracción del medio en el cual se encuentra la partícula,  $m$  el índice efectivo que es la división entre el índice de refracción de la partícula y el índice de refracción del medio, y  $c$  la velocidad de la luz, tenemos que la fuerza de dispersión [2, 79] es

$$F_s = \frac{I_0 n_m}{c} \frac{128 \pi^5 r^6}{3 \lambda^4} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2. \quad (2.9)$$

Finalmente, para obtener una trampa estable, la relación entre la fuerza de gradiente y la de scattering [2] debe ser

$$R = \frac{F_g}{F_s} \geq 1. \quad (2.10)$$



### 2.1.3. Régimen intermedio $r \sim \lambda$

Para el régimen intermedio, en donde el tamaño de las esferas atrapadas son del orden de la longitud de onda utilizada, se utiliza la teoría desarrollada por Viana y su equipo de trabajo [80] en donde se desarrolla la teoría de *Mie – Debye* con incorporación de correcciones de aberraciones esféricas (MDSA). Esta teoría considera los efectos de la diferencia de los índices de refracción del cubreobjeto y el líquido de inmersión del lente objetivo utilizado. Esto último, produce aberraciones ópticas. Los resultados experimentales para la validación de esta teoría, consideró una trampa óptica en donde se usó un láser  $\lambda = 0.832 \mu\text{m}$  y se midió la proporción entre la constante de rigidez transversal  $\bar{\kappa}_\perp$  y la potencia transmitida por el lente objetivo  $P_{LO}$  en función del radio  $r$  de la esfera atrapada. Sus resultados son mostrados en la figura 2.2.

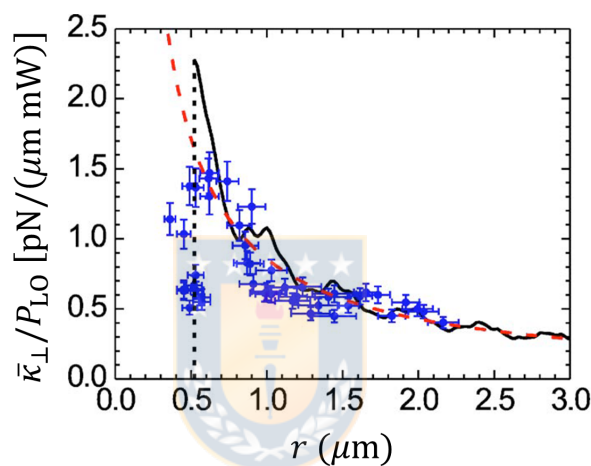


Figura 2.2: Rigidez transversal de una trampa (dividido por la potencia local  $P_{LO}$ )  $\bar{\kappa}_\perp/P_{LO}$  en función del radio  $r$  de la esfera atrapada. La curva experimental mostrada por los puntos azules, se compara con la predicción de la teoría de *Mie – Debye* con incorporación de correcciones de aberraciones esféricas (MDSA), indicada con línea negra continua, y con la teoría de óptica geométrica (GO), mostrada con línea roja segmentada. Fuente de imagen:[80].

En la figura 2.2, el gráfico  $\bar{\kappa}_\perp/P_{LO}$  en función del radio  $r$  de la esfera atrapada muestra los resultados experimentales obtenidos, los cuales, permiten comparar las predicciones sobre la estabilidad del atrapamiento realizadas en base a la teoría MDSA y la óptica geométrica. Los resultados muestran que la curva teórica de MDSA, indicada por la línea negra continua, predice una inestabilidad de la trampa para el atrapamiento de esferas con  $0.04 < r < 0.52 \mu\text{m}$ , ajustándose de buena manera a la curva experimental indicada por los puntos azules. Lo anterior muestra que esta teoría tiene un buen comportamiento predictivo en todo el rango de tamaños considerados. Por su parte, la teoría de óptica geométrica indicada por la línea roja discontinua, muestra un buen ajuste a los datos experimentales dentro de un rango menor de tamaños, es decir, tiene una validez predictiva



respecto a la estabilidad del atrapamiento para valores de  $r \geq 0.52 \mu\text{m}$ , en donde los valores máximos de los radios considerados en la gráfica son de  $\sim 2 \mu\text{m}$ . Finalmente, se puede decir que la comparación entre ambas teorías, muestra que MSDA es una teoría que permite estimar de manera correcta el comportamiento del atrapamiento óptico de esferas de un radio  $r$  que comprende el régimen geométrico y un régimen intermedio en donde  $r$  es similar a la longitud de onda  $\lambda$  utilizada para atrapar. Lo anterior, contrasta con las predicciones de la óptica geométrica, las cuales, comienzan a perder validez en el entorno en que el radio  $r$  de las esferas comienza a ser similar o más pequeño que  $\lambda$ .

## 2.2. Densidad espectral de potencia para partículas confinadas mediante pinzas ópticas

Mediante la descripción del movimiento browniano asociado a una partícula en confinamiento óptico es posible obtener la densidad espectral de potencia (PSD) de dicha partícula. El movimiento browniano asociado a una partícula en un potencial armónico puede ser descrito mediante la ecuación de Langevin [81] que es descrita como

$$m\ddot{x}(t) + \gamma\dot{x}(t) + \bar{\kappa}x(t) = \sqrt{2k_B T \gamma} \xi(t). \quad (2.11)$$

El lado derecho de la ecuación 2.11 incluye el término  $k_B T$ , el cual corresponde a la energía térmica, donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta. Además, el término  $\xi(t)$  es asociado al movimiento browniano de la partícula. El lado izquierdo incorpora tres términos. El primer término,  $m\ddot{x}(t)$ , corresponde al movimiento inercial de la partícula, donde  $m$  es la masa de ésta. El tercer término,  $\bar{\kappa}x(t)$ , es asociado a la fuerza de restauración, donde  $\bar{\kappa}$  es la rigidez de la trampa. El segundo término,  $\gamma\dot{x}(t)$ , describe la fricción del medio en el cual se encuentra la partícula, siendo  $\gamma$  el coeficiente de fricción o arrastre el cual puede ser expresado en función del radio  $r$  de la partícula y del coeficiente de viscosidad  $\eta$  de acuerdo a la ley de Stokes, lo que se denota como

$$\gamma = 6\pi r \eta. \quad (2.12)$$

Una partícula confinada en un medio acuoso corresponde a un sistema sobre-amortiguado [82], por lo cual el término inercial es despreciado y es posible describir el movimiento según la siguiente ecuación:

$$\gamma\dot{x}(t) + \bar{\kappa}x(t) = \sqrt{2k_B T \gamma} \xi(t). \quad (2.13)$$

El término  $\bar{\kappa}x(t)$  de la ecuación 2.13 corresponde a la fuerza armónica de la trampa, donde  $\bar{\kappa}$  es la rigidez de esta y puede ser obtenida mediante el espectro de potencia (PSD) asociado a los desplazamientos de la partícula producto del movimiento browniano. De acuerdo al trabajo realizado por Sorensen y Flyvbjerg [83], es posible obtener una expresión para el espectro de potencia de la trampa óptica. Para ello, introducimos la constante de

difusión de Einstein  $D = k_B T / \gamma$  y la ecuación para la frecuencia de corte  $f_c$  expresada como

$$f_c = \frac{\bar{\kappa}}{2\pi\gamma}. \quad (2.14)$$

Considerando la expresión 2.14, la ecuación 2.13 puede ser reescrita, de manera de obtener

$$\dot{x}(t) + f_c [2\pi x(t)] = (2D)^{1/2} \xi(t). \quad (2.15)$$

Ahora, se debe realizar la transformada de Fourier de  $x(t)$  y  $\xi(t)$  considerando la definición dada por

$$\widetilde{X}_k(f) = \int_{-T_{\text{msr}}/2}^{T_{\text{msr}}/2} x(t) e^{2\pi i f_k t} dt. \quad (2.16)$$

En la ecuación 2.16, el término  $f_k$  son frecuencias en el espacio de Fourier que están asociadas al tiempo de medida ( $f_k = k/T_{\text{msr}}$ , con  $k$  entero y  $T_{\text{msr}}$  el tiempo de medición). Aplicando entonces la transformada de Fourier a la ecuación 2.15 se puede obtener la relación

$$\widetilde{X}_k(f) = \frac{(2D)^{1/2}}{2\pi(f_c - i f_k)} \widetilde{\xi}_k(f). \quad (2.17)$$

Por otro lado, el término asociado a la fuente de ruido browniano  $\xi(t)$  cumple las expresiones  $\langle \xi(t) \rangle = 0$  y  $\langle \xi(t) \xi(t') \rangle = \delta(t - t')$  para todo tiempo  $t$  y  $t'$ , desde lo cual se obtiene

$$\langle \widetilde{\xi}_k \rangle = 0 \quad \text{y} \quad (2.18)$$

$$\langle \widetilde{\xi}_k \widetilde{\xi}_l^* \rangle = T_{\text{msr}} \delta_{k,l}. \quad (2.19)$$

Ahora, considerando la ecuación 2.17, es posible obtener el espectro de potencia experimental para valores de  $k > 0$ , el cual se encuentra dado por

$$P_k^{\text{ex}} \equiv \frac{|\widetilde{X}_k(f)|^2}{T_{\text{msr}}} = \frac{(D/2\pi^2 T_{\text{msr}})}{f_c^2 + f_k^2} |\widetilde{\xi}_k|^2. \quad (2.20)$$

De esta manera, la ecuación 2.20 junto a las expresiones de las ecuaciones 2.18 y 2.19, permite expresar el valor esperado el espectro de potencia experimental como

$$P_k \equiv \langle P_k^{\text{ex}} \rangle = \frac{D}{2\pi^2 (f_c^2 - f_k^2)}. \quad (2.21)$$

La ecuación 2.21 corresponde a una función Lorentziana, y es la expresión teórica para la PSD de una partícula confinada en una trampa óptica. El ajuste de esta expresión sobre

la PSD experimental de una partícula atrapada en un potencial óptico, ha sido implementada por Tolić-Nørrelykke et al. mediante un algoritmo avanzado de análisis utilizando MATLAB [84]. Este algoritmo cuenta con herramientas tales como filtros de frecuencias y consideraciones hidrodinámicas de forma de obtener, de la manera más precisa posible, parámetros como la frecuencia de corte  $f_c$  y la constante de difusión de Einstein  $D$ . Además, el mismo Tolić-Nørrelykke ha desarrollado métodos de calibración avanzados, desarrollados a partir de estas mismas expresiones y el algoritmo de análisis desarrollado por él. Este método de calibración ha sido utilizado no sólo para la obtención de factores que conviertan medidas arbitrarias de sensores a nanómetros, sino que también, para la determinación experimental del coeficiente de arrastre  $\gamma$  de una partícula coloidal inmersa en un fluido y que se encuentra atrapada en un potencial óptico [85].

## 2.3. Tipos de ruido por origen físico en instrumentación con esquemas de pinzas ópticas

En experimentos en donde es utilizada instrumentación basada en esquemas de pinzas ópticas, ya sean en su régimen de atrapamiento fuerte o débil, existen perturbaciones en los montajes experimentales que pueden afectar de manera importante las mediciones si no son abordados correctamente, teniendo como consecuencia, la pérdida de las capacidades resolutivas del instrumento. Por lo anterior, aquí tratamos de manera resumida los principales conceptos y consideraciones previas a tener en cuenta al momento de trabajar con este tipo de sistemas. Una manera de clasificar los ruidos puede ser por su origen físico, es decir, por fenómenos que perturban la señal debido procesos que se originan, por ejemplo en la interacción luz materia, procesos térmicos y efectos mecánicos debido a múltiples factores. A continuación, se presenta una breve descripción de estos tipos de ruido.

### 2.3.1. Ruido cuántico de disparo

El desarrollo de instrumentación óptica, en general, considera la utilización de múltiples tipos de foto-sensores basados en el efecto fotoeléctrico para capturar variaciones de señales y así detectar procesos físicos de interés. El arribo estadístico de fotones a estos sensores generan señales de corriente, lo que implica movimiento de electrones y, en la mayoría de los casos, componentes electrónicas convierten estas señales desde analógicas a digitales. Es por las características de medición de la instrumentación mencionada que existe un tipo de ruido presente en estos sistemas, el llamado ruido de disparo o shot noise. El ruido de disparo es un tipo de ruido electrónico que puede ser modelado por un proceso poissoniano [86] y que se origina en electrónica debido a la naturaleza discreta de las cargas [86–88], las cuales producen fluctuaciones de corriente. El ruido de disparo también ocurre en dispositivos ópticos utilizados para el fotoconteo, en donde éste se relaciona con la naturaleza corpuscular de la luz [86]. De lo anterior, es relevante notar que los electrones comparten junto a los fotones la dualidad onda-partícula por lo que no es extraño que en aparatos de medición en donde ambos estén presentes existan fluctuaciones de corriente eléctrica [87]. Una forma más explícita de explicar el ruido de disparo es la realizada por

B. Scott. [86], el cual menciona que este es producido debido a que los fenómenos de la luz y la corriente eléctrica consisten de movimientos de paquetes discretos o también llamados cuantizados. Un ejemplo para entender esto, es mencionado por el mismo autor. Considere entonces luz siendo emitida desde un puntero láser como una corriente de fotones discretos que al mirarlos sobre una pared generan un punto con un cierto brillo o intensidad. Los procesos físicos involucrados indican que los fotones serán emitidos de manera aleatoria. Sin embargo, los millones de fotones que crean este punto brillante, es decir, el número de fotones por unidad temporal, varían infinitesimalmente en el tiempo. Si ahora el brillo del láser se reduce hasta que sólo unos pocos fotones incidan sobre la pared, las fluctuaciones en el número de fotones en el tiempo serán significativas, tal como cuando lanzamos una moneda al aire unas pocas veces y comparamos la cantidad de caras o sellos. A estas fluctuaciones se le llama ruido de disparo y, de acuerdo a este ejemplo, a las fluctuaciones temporales en el número de partículas. Es por esto que, en un contexto electrónico, las fluctuaciones de corriente dependientes del tiempo debido a la naturaleza discreta de las cargas eléctricas también es conocido como ruido de disparo [87,88]. En específico, cuando la corriente de cargas fluye, fluctuaciones de carga debido a la granularidad y naturaleza estocástica del transporte pueden ser apreciadas [88]. Desde un punto de vista histórico, el término ruido de disparo fue acuñado por Walter Schottky cuando predijo en 1918 que un tubo de vacío tendría dos fuentes intrínsecas de fluctuaciones de corriente en el tiempo, una debida a efectos térmicos y la otra al ruido de disparo [87–89]. El ruido de disparo puede ser dominante entonces cuando un número finito de partículas que transportan energía, tales como los electrones o los fotones, es suficientemente pequeño de manera que la incerteza debido a la distribución poissoniana, responsable de describir la ocurrencia de eventos azarosos independientes, es significativa [86]. Para grandes números de eventos, la distribución poissoniana se aproxima a una distribución normal entorno a su media y los eventos individuales no pueden ser observados, haciendo que el ruido de disparo sea indistinguible respecto del ruido Gaussiano [86]. Dado que la desviación estándar del ruido de disparo es igual a la raíz del número de eventos  $N_e$ , entonces la proporción señal a ruido (SNR, por sus siglas en inglés), será  $SNR = N_e/\sqrt{N_e}$  [86], de esta manera, para muchos eventos otras fuentes de fluctuación dominan en la señal, pero si el número de eventos es bajo y los niveles de otras fuentes de ruido están fijos o crecen más lento que  $\sqrt{N_e}$ , entonces esto puede hacer que el ruido de disparo domine. Conceptos respecto a la proporción de señal a ruido de manera más general serán tratados más adelante. Finalmente, es importante recalcar desde el desarrollo histórico del estudio del ruido de disparo que, mucha de la información física que este contiene, ha sido apreciada recientemente a partir de experimentos en la nanoescala donde la mecánica clásica falla. En estas escalas el ruido de disparo entrega información rica en detalles acerca del transporte de cargas [87, 90] como ya ha sido mencionado.

### 2.3.2. Ruido mecánico y vibracional

Los problemas causados por vibraciones mecánicas son un problema a considerar y minimizar cuando hablamos de montajes de sistemas y, en particular, para mediciones ópticas de precisión. Cuando adquirimos señales con alta resolución como por ejemplo

con pinzas ópticas dobles, AFM u otros aparatos que detectan desplazamientos y fuerzas subnanométricos y sub-piconewton respectivamente, se hace indispensable minimizar cualquier vibración que pueda introducir ruido al sistema, y como consecuencia, a la medición. A estas perturbaciones provenientes de vibraciones mecánicas le llamamos ruido mecánico.

Una forma de categorizar los ruidos asociados a fuentes de vibraciones mecánicas es dividirlos y tratarlos en dos subdivisiones. Una de ellas son las fuentes que generan vibraciones de gran amplitud y la otra fuentes que generan perturbaciones en la medida [91]. Las fuentes de vibraciones de gran amplitud producen generalmente daños a equipos debido a que la mayoría de los problemas de este tipo son causadas por condiciones de resonancia [92], aunque por supuesto, este tipo de vibraciones pueden tener también como consecuencia perturbaciones en la medición. En este sentido, grandes vibraciones pueden ser generalmente detectadas de manera simple ya que están asociados a los ruidos que se generan. Para evitar las consecuencias por vibraciones de gran amplitud, es necesario sacar de resonancia al equipo con la vibración. De acuerdo a I.R. Walker [91], una lista de posibles fuentes de vibración de grandes amplitudes son: bombas y compresores cercanas a montajes, flujos de gas y líquidos por mangueras, ventilaciones de refrigeración e incluso fuerzas electromagnéticas asociadas a campos magnéticos de 50 Hz actuando sobre conductores.

Por otro lado, el segundo tipo de fuentes de vibraciones mecánicas, asociadas a perturbaciones directas en la medida, están asociadas en general a frecuencias bajas de vibración. Dado que las vibraciones de baja frecuencia son más difíciles de tratar que las de alta frecuencia [91], la detección de ruidos asociadas a estas fuentes se convierte en algo más dificultoso. En relación a lo anterior, una lista resumida de sistemas en donde se presentan estos problemas es mostrada en la tabla 2.1 [91].

Sistema	Consecuencia de las vibraciones
Sistemas ópticos	Ruido en mediciones interferométricas y otros
Microscopios	Imágenes borrosas
Instrumentos electrónicos	Introducción de ruido por movimientos de cables, flexión de cables en circuitos de gran impedancia y fenómenos microfónicos por sensibilidad a las vibraciones de algunos componentes electrónicos y detectores

Tabla 2.1: Degradación de las mediciones por efecto de vibraciones mecánicas en diferentes contextos y sistemas.

Es importante considerar que muchas de las fuentes de vibración que afectan directamente a la medida no son de naturaleza constante, aunque otras sí lo son. Para ejemplificar lo anterior, una lista de fuentes para esta categoría de vibraciones es descrita abajo.

- Bombas mecánicas y compresores.

- Calefacción de edificios, ventilación y aire acondicionado.
- Tornos y otros equipos de taller.
- Generadores continuos.
- Sistemas de enfriamiento de agua (Chillers).
- Actividades humanas tales como pisadas en pisos no rígidos que soportan equipos sensibles y portazos.
- Movimiento de grandes objetos y cilindros.
- Tráfico cercano en carreteras, y particularmente carreteras e intersecciones concurridas (en el rango de frecuencias de 15 – 70 Hz).
- Grandes transformadores eléctricos.
- Ondas de sonido.

En particular, las fuentes de vibraciones mecánicas indicadas en la lista mostrada arriba y otras similares, generan frecuencias de vibración particulares. Para una correcta descripción de las frecuencias asociadas a estas fuentes, es presentada la tabla 2.2 [93]

Sistema	Frecuencias (Hz)
Compresores de Aire	4 – 20
Equipos transportables	5 – 40
Bombas de vacío y compresores de fluidos	5 – 25
Servicios del edificio	7 – 40
Tráfico de pasos	0.5 – 6
Acústicos	100 – 10000
Transformadores	50 – 400
Ascensores	hasta 40
Movimientos del edificio	46 por metro de altura
Tráfico de autopistas cercanas	5 – 100
Trenes	5 – 20

Tabla 2.2: Frecuencias asociadas a diferentes fuentes de vibraciones mecánicas.

De manera más específica describiremos brevemente, de acuerdo a lo indicado en [91], dos aspectos fundamentales a considerar en montajes de instrumentos ópticos basados en esquemas de pinzas ópticas. Estos están enfocados en evitar ruidos mecánicos y vibraciones en los soportes de la instrumentación.

## *Vibraciones en estructuras de soporte de la instrumentación*

Las vibraciones resonantes en soportes de la instrumentación óptica completa, tal como los bancos ópticos, puede ser un problema durante la medición. Al realizar experimentos y mediciones frecuentemente se utilizan bancos ópticos muy rígidos y a la vez ligeros que cuenten con sistemas de amortiguación. Además, estos tienen una estructura de panal de abeja en donde se fijan todas las sub-estructuras y en donde su sistema de amortiguación aísla la óptica del instrumento de vibraciones dentro del rango 4 – 100 Hz [93].

## *Rigidez y estabilidad de monturas ópticas*

En experimentos de óptica, como en los descritos por este trabajo, las monturas de los elementos ópticos tales como lentes, espejos y lentes objetivo de microscopio, son los que determinan en mayor medida la sensibilidad a las vibraciones mecánicas del instrumento físico construido [94], incluso más allá que el mismo banco óptico aísla vibraciones mecánicas de frecuencias bajas. Por lo anterior es necesario preocuparse acerca de las bases mecánicas que sostienen cada elemento óptico. En casos en donde las vibraciones son relevantes, se debe estar atento a que las monturas de la óptica sean lo más rígidas posible y que el acoplamiento entre el banco óptico y estas monturas se encuentren lo más acopladas posible, así como también las componentes ópticas con las monturas [91,94]. Lo anterior asegurará que la aislación que provee el banco óptico sea efectiva, generando un montaje rígido, firme y estable. Otro aspecto relevante es que las monturas ópticas sean diseñadas o escogidas para tener alturas lo más bajas posible. Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta, es la distribución de las bases que soportan las componentes ópticas. Estas debieran ser distribuidas lejos de las esquinas del banco óptico debido a que las amplitudes de vibración más grandes se dan en las esquinas del banco óptico. Finalmente, es de considerar que los dispositivos mecánicos para ajustar posiciones son una fuente de inestabilidad y vibraciones que deben ser tomadas en cuenta al evaluar posibles mejoras al sistema de medición [91].

No obstante lo ya planteado, múltiples fuentes de ruido mecánico y vibración pueden surgir dependiendo del diseño particular de herramientas ópticas como las basadas en pinzas ópticas. Por lo anterior, se deben considerar tener la suficiente precaución para poder indentificarlas y disminuir su influencia sobre las medidas.

### **2.3.3. Ruido fundamental en pinzas ópticas: El movimiento browniano**

Los desafíos de la instrumentación basada en esquemas de pinzas ópticas está relacionada con múltiples factores, tanto de componentes mecánicos como de sensores. Sin embargo, existe una limitación fundamental para este tipo de instrumentos y la resolución espacial que puedan alcanzar la cual está relacionada con los efectos térmicos sobre las partículas atrapadas cuando se utilizan principalmente pinzas ópticas de atrapamiento fuerte. Para



una descripción cualitativa, pensemos en el atrapamiento de una esfera mediante pinzas ópticas. Considere entonces una esfera atrapada unida a un sistema biológico el cual puede estar ejerciendo fuerzas de tensión sobre esta. En este esquema, es posible medir su posición desplazada respecto al centro de la trampa. Sin embargo, existirá una fluctuación de la señal de posición de la esfera que determinará qué tan precisa será la determinación de esa posición de desplazamiento. La incerteza con que determinemos esta posición de desplazamiento de la esfera será entonces la resolución espacial. La mayor o menor resolución espacial entonces está relacionada a múltiples factores de ruido instrumental como ya se ha mencionado. En particular, la resolución espacial estará limitada por el ruido y deriva de la posición de una variedad de fuentes que se pueden categorizar entre las provenientes del entorno o experimentales y las provenientes de las fuerzas térmicas que afectan a la partícula atrapada [5]. Las fuentes experimentales provenientes de ruidos mecánicos como inestabilidades de las monturas o de la intensidad del láser utilizado, pueden influir de tal manera que el movimiento de la esfera atrapada sea indistinguible del ruido generado por estos movimientos [4]. A pesar de ello, una buena elección de componentes y diseño puede permitir superar estos problemas. Sin embargo, existe un límite dada la característica finita de la rigidez de atrapamiento de la trampa óptica y los efectos térmicos sobre la esfera. En particular, las fuerzas térmicas sobre la esfera no pueden ser evitadas y proveen un límite fundamental para la resolución espacial [5]. En este sentido, se debe considerar que una partícula atrapada tiene un movimiento browniano debido a los efectos térmicos antes mencionados. La esfera atrapada tiene una energía cinética dentro de la trampa definida por  $k_B T$ , en donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura, en donde para que la esfera esté atrapada, un potencial  $U$  de atrapamiento debe superar la energía cinética de la esfera de forma que sea improbable que la esfera escape por movimiento browniano [95]. Si lo anterior se cumple, sobre la esfera se equilibran tres fuerzas, las cuales son la fuerza de la trampa óptica, la tensión del sistema biológico y las fuerzas térmicas azarosas que actúan sobre ella al estar inmersa en un medio acuoso. Es importante aquí entender que las fuerzas inerciales y viscosas son despreciables a escalas de tiempo largas [5, 83]. La incerteza en la determinación de la posición de la esfera también introduce incerteza en las fuerzas aplicadas sobre el sistema biológico. Sin embargo, los efectos de las fuerzas brownianas pueden ser calculados y los parámetros físicos pueden ser escogidos para minimizar los efectos de esta incerteza.

## 2.4. Conceptos acerca del SNR en señales

En el análisis de señales temporales, es fundamental tener una herramienta que permita evaluar la calidad de la señal que se está adquiriendo. Esto se refiere principalmente a conocer cuánta cantidad de información tenemos en esa señal asociada con el proceso físico que deseamos medir comparado con el ruido propio del sistema. Con el fin de evaluar esta calidad de la señal se utiliza el denominado parámetro señal a ruido o SNR por sus siglas en inglés. El SNR por lo tanto ha sido definido de múltiples formas dependiendo la señal de interés medida. En el contexto de señales electrónicas, ha sido definido de manera general este parámetro como la magnitud de una señal respecto al ruido del sistema en términos



de las potencias de estas señales [96], lo que es expresado como

$$\text{SNR} = \frac{\text{Nivel de potencia de señal}}{\text{Nivel de potencia del ruido}}, \quad (2.22)$$

o si es preferido, en términos de decibeles ( $dB$ ),

$$\text{SNR}_{dB} = 10 \log_{10}(\text{SNR}). \quad (2.23)$$

En general, un valor de SNR menor a 1, es indicativo de que el ruido en la señal adquirida es mayor a la señal de interés [96, 97]. Una definición alternativa del SNR en escala lineal es el recíproco del coeficiente de variación (CV), el cual es definido como

$$\text{SNR}_{CV} = \frac{\mu_x}{\sigma_x}, \quad (2.24)$$

en donde  $\mu_x$  es la media de la señal temporal y  $\sigma_x$  su desviación estándar. También existen otras definiciones particulares del SNR, por ejemplo, en el contexto del conteo de fotones y partículas. Es así que el SNR ha sido definido para evaluar el ruido de disparo [86, 97] en una señal para procesos modelados por estadística Poissoniana, siendo su expresión

$$\text{SNR} = \frac{N_e}{\sqrt{N_e}}. \quad (2.25)$$

Comparando la ecuación 2.24 con 2.25, se puede indicar que en 2.25,  $N_e$  expresa el promedio de partículas o eventos y  $\sqrt{N_e}$  la desviación estándar.

En el contexto particular de pinzas ópticas, también se han realizado definiciones en términos de parámetros físicos para detectar la calidad de la señal temporal de una esfera atrapada en donde el ruido térmico o browniano es intrínseco a la medida. Aunque los efectos del ruido térmico o movimiento browniano de la partícula atrapada nunca pueden ser eliminados por completo de la medida, su dependencia de parámetros físicos del experimento pueden ser utilizados para minimizar su influencia. Es así que trabajos fundamentales sobre pinzas ópticas [5, 73] han descrito proporciones de señal a ruido en términos de parámetros físicos del problema, en donde en particular para un sistema de medición de una sola trampa óptica de atrapamiento fuerte, su expresión es

$$\text{SNR} \leq \frac{\kappa_L \Delta l}{\sqrt{4k_B T B \gamma}}. \quad (2.26)$$

En el SNR de la ecuación 2.26,  $\kappa_L$  es la constante de rigidez del ligando o sistema biológico estudiado,  $\Delta l$  la magnitud de su desplazamiento físico,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura,  $B$  es el ancho de banda en frecuencia de la medición, correspondiente a la mitad de la tasa a la que se recopilan los datos experimentales, y  $\gamma = 6\pi\eta r$  la constante de fricción o arrastre de la esfera atrapada en donde  $\eta$  es la viscosidad del medio acuoso en donde se encuentra y  $r$  su radio. Este tipo de análisis junto a nuevas estrategias de medición en sistemas de pinzas ópticas, han permitido disminuir aún más las influencias de los ruidos y mejorar los valores del SNR de las mediciones del instrumento. En particular, el uso de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte más el uso

de coordenadas diferenciales, ha sacado provecho de las correlaciones entre dos puntos de atrapamiento para obtener resoluciones espaciales sub-nanométricas con una mejora sustancial del SNR de este tipo de instrumentos respecto al de pinzas ópticas únicas. Lo anterior, es parte central del tipo de herramientas desarrolladas en este trabajo por lo cual, su implementación y el análisis del SNR para este tipo de sistemas será analizado en detalle más adelante.

## 2.5. Herramientas experimentales en biología basadas en esquemas de pinzas ópticas

Hasta el momento, se ha tratado en términos generales la teoría a considerar para la realización de experimentos basados en esquemas de pinzas ópticas. Dado que estas se han convertido en una herramienta versátil para el estudio en diversos campos, tanto biológicos como de física fundamental [31, 39, 44, 98], en este capítulo revisaremos los escenarios biológicos generales en donde este tipo de herramientas son aplicadas, como también, los relacionados de manera particular con este trabajo y las herramientas de medición desarrolladas para enfrentarlos. En específico, será descrita la técnica TRMFS, la cual permite estudiar fluctuaciones de membrana y parámetros mecánicos de glóbulos rojos bajo distintas condiciones [31, 39, 44], como también, la técnica de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte desarrollada por Moffitt y su grupo de trabajo [10–16]. Esta última, permite utilizar una estrategia experimental para mejorar la resolución espacial respecto de pinzas ópticas tradicionales en base a la utilización de coordenadas diferenciales.

### 2.5.1. Escenarios biológicos para uso de esquemas de pinzas ópticas

Cuando hablamos de herramientas de medición basadas en esquemas de pinzas ópticas, los escenarios de estudio son diversos y pueden considerarse interdisciplinarios. En este sentido, los temas abordados con este tipo de herramientas de medición van desde moléculas únicas hasta células individuales y micro-fluídica. En particular, cambios conformacionales producidos por procesos celulares como catálisis enzimática y aperturas de canales iónicos, están relacionados con movimientos de dominios de proteínas en la escala del Angstrom los cuales a su vez son producidos por fuerzas internas muy pequeñas [5]. Por otro lado, fluctuaciones de membranas de glóbulos rojos producidas tanto por efectos puramente térmicos como también por su actividad metabólica interna se encuentran en el orden de las decenas de nanómetros [31, 39]. Por lo anterior, se puede decir que las fuerzas a escalas celulares y moleculares son fundamentales en procesos biológicos como también sus cambios conformacionales que son un reflejo de ellas. Es respecto a estos desafíos que los esquemas de pinzas ópticas se han convertido en una herramienta fundamental para el estudio de este tipo de sistemas debido a su capacidad de medir desplazamientos con resoluciones espaciales nanométricas e incluso sub-nanométricas, y de ejercer fuerzas muy pequeñas [5, 47] sobre estos sistemas cuando una micro-esfera es adherida al sistema

biológico en estudio. Un resumen de las capacidades que entregan distintas herramientas basadas en esquemas de pinzas ópticas y herramientas similares [31, 39, 47, 99] es mostrado en la tabla 2.3 .

Característica	Pinzas Ópticas	Pinzas Magnéticas	TRMFS	Microscopio de Fuerza Atómica
Resolución espacial (nm)	0.1 – 2	5 – 10	$\sim 1$ *	0.5 – 1
Resolución temporal (s)	$10^{-4}$	$10^{-1} - 10^{-2}$	$10^{-4} - 10^{-5}$ *	$10^{-3}$
Rigidez (pN/nm)	0.005 – 1	$10^{-3} - 10^{-6}$	N/A	$10 - 10^5$
Rango de Fuerza (pN)	0.1 – 100	$10^{-3} - 10^2$	N/A	$10 - 10^4$
Rango de desplazamiento (nm)	$0.1 - 10^5$	$5 - 10^4$	N/A	$0.5 - 10^4$
Tamaño de elemento de prueba ( $\mu\text{m}$ )	0.25 – 5	0.5 – 5	$\sim 0.5$ (spot)	100 – 250

Tabla 2.3: Tabla comparativa entre diferente instrumentación para medir desplazamientos y fuerzas en sistemas biológicos basados en esquemas de pinzas ópticas y en otros principios de funcionamiento tales como el microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés). Los valores señalados con (\*) para TRMFS, son valores típicos de la técnica para medición de fluctuaciones de membranas (resoluciones espaciales nanométricas y adquisición de datos típica a tasas de 100 o 200 kHz, en donde se debe considerar para esto último el teorema de Nyquist), no obstante, cierta parte de la literatura relacionada a esta técnica indica valores incluso superiores, señalando valores de resolución espacio-temporal de orden sub-nanométrico y  $\mu\text{s}$ , respectivamente. Valores e indicaciones de la tabla en relación a los trabajos [31, 39, 47] y [99].

La tabla 2.3, muestra que las capacidades de resolución tanto espacial como temporal para las pinzas ópticas y TRMFS, son similares o más altas en comparación con las pinzas ópticas magnéticas y la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés). Por lo anterior, estas técnicas han sido ampliamente utilizadas en un gran número de aplicaciones desde que fueron creadas. Virus, bacterias, levaduras, células eucariotas e incluso organelos celulares han podido ser atrapados directamente para su estudio [100–102]. Otra muestra más de la diversidad de aplicaciones de esquemas de pinzas ópticas para estudio de sistemas biológicos y caracterización de fuerzas y desplazamientos son los estudios sobre mitoccondrias [103], elasticidad de polímeros de ADN de doble hebra [104] con aplicación de fuerzas de 80 pN, elasticidad de glóbulos rojos [18, 105],

atrapamiento de espermatozoides para estudio de su movilidad [106], procesos de mitosis [107–109] y estudios de interacción membrana-citoesqueleto en procesos de difusión de proteínas en membranas [110–112]. Si bien estos ejemplos están ligados al uso de pinzas ópticas de atrapamiento fuerte, otros ejemplos se pueden dar a partir de la utilización de pinzas ópticas débiles. Estas últimas han sido usadas principalmente para ver efectos sobre las fluctuaciones de las membranas de glóbulos rojos y sus propiedades mecánicas al imponer condiciones de falta de ATP, activación del PKC, y estudios específicos en neuritas y vesículas, entre otros [31,39,44,48,49]. De manera de ejemplificar la diversidad de estudios posibles con herramientas basadas en esquemas de pinzas ópticas, se muestra en la tabla 2.4 un resumen de diversos estudios realizados junto a sus magnitudes características.

Proceso de estudio	Herramienta de estudio	$\Delta x_d$ (Å)	Fuerza (pN)
Glóbulos rojos: Efectos del ATP sobre fluctuaciones de membrana [31]	TRMFS	330	N/A
Neuritas: Fluctuaciones transversales de membrana [48]	TRMFS	100	N/A
Kinesina moviéndose por microtúbulos [68]	Pinza óptica única de atrapamiento fuerte	80	5
RNA polimerasa (RNAP) desplazándose en transcripción de ADN [113]	Pinza óptica dual de atrapamiento fuerte	3.7	5 – 29
Empaquetamiento ADN [114]	Pinza óptica dual de atrapamiento fuerte	34	40

Tabla 2.4: Estudios realizados mediante instrumentación basada en esquemas de pinzas ópticas y las magnitudes características medidas que describen los procesos de estudio.

A partir de lo ya expresado, a continuación describiremos de manera más detallada los principios y métodos implementados en este trabajo. Estos se relacionan con el uso de la técnica TRMFS para estudios de membranas lipídicas y sus propiedades mecánicas y, por otro lado, con las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, en donde su uso se justifica a partir de las ventajas comparativas de esta instrumentación respecto a otras utilizadas para los mismos fines, como ya ha sido mostrado en la tabla 2.3.

### 2.5.2. Pinzas ópticas para estudio de fluctuaciones de membranas: TRMFS

El estudio de fluctuaciones y de propiedades mecánicas de membranas celulares ha sido un tópico de amplia investigación dada la relación entre la dinámica vibracional con variadas funciones metabólicas y de equilibrio célula-ambiente. Para su estudio, se han

usado sólo glóbulos rojos debido a que la composición de su membrana, libre de organelos internos, representa un sistema biológico ideal para investigar las interacciones de compuestos químicos con la pared celular [115–117]. Esta simplicidad estructural permite que la membrana de los glóbulos pueda ser considerada como un objeto homogéneo que produce cambios de fase ópticos proporcionales a su espesor local. El estudio particular de las membranas de glóbulos rojos se hace relevante bajo diferentes contextos, dado que los estudios de fluctuaciones de membrana que se han hecho desde la década de los 70, indican que estos podrían contribuir fuertemente a la evaluación de procesos celulares y por lo tanto, podrán jugar un rol fundamental en diagnósticos de enfermedades cardiovasculares, entre otras.

La necesidad de investigar la dinámica de membranas ha permitido el desarrollo de técnicas para estudios de paredes celulares basadas en los trabajos pioneros de Helfrich [118–121]. En estos estudios, Helfrich reconoció que el cambio de la membrana desde su forma energéticamente favorable, conlleva un costo energético gobernado por la rigidez de flexión (módulo de flexión) de la bicapa lipídica [120], y en donde pudo determinar de manera teórica y experimental, la rigidez de flexión de una membrana a partir del análisis en frecuencias (uso de Transformada de Fourier) de su fluctuación temporal. En particular, las técnicas desarrolladas en base a estos resultados han sido, principalmente, técnicas ópticas no invasivas. Una de las más usadas para el estudio de membranas de glóbulos rojos bajo diferentes condiciones, dada su sensibilidad, es TRMFS [31, 39, 44, 47–49]. Esta técnica permite resoluciones espaciales nanométricas ( $\sim 1$  nm) y temporales típicamente en el rango de  $10^{-4} - 10^{-5}$  s, en donde como ya se ha dicho, una parte de la literatura asociada a la técnica señala que su resolución espacial puede ser sub-nanométrica y que su resolución temporal se encuentra en el orden de los  $\mu$ s [31, 39, 47]. Su funcionamiento está basado en el uso de pinzas ópticas débiles [15, 31], y considera la detección de los cambios de posición de un láser colocado en el borde de la célula en el régimen en donde el sistema óptico no produce atrapamiento. La diferencia del índice de refracción entre el medio circundante y el interior de la célula hace que la trayectoria de la luz se desvíe a medida que la membrana fluctúa. Esto permite la medición directa de las fluctuaciones de la membrana alrededor de la posición de equilibrio y, como consecuencia, el análisis de la densidad espectral de potencia de la señal (PSD), que en conjunto con un modelo matemático de la membrana, permite la determinación de algunos parámetros mecánicos como la tensión de la membrana, módulo de flexión y la viscosidad efectiva [31, 39, 44, 47–49]. Esta técnica ya se ha utilizado para obtener parámetros mecánicos de glóbulos rojos, membranas lipídicas [31, 47] y neuronas de PC12 [48, 49].

En particular, la técnica TRMFS aprovecha el esquema de mediciones de pinzas ópticas débiles para mediciones de deflexión lateral, pero a baja potencia, de tal forma de no atrapar. Aquí, un haz de baja potencia incide sobre la bicapa lipídica y es parcialmente dispersado. Esta señal incide luego sobre un detector de cuatro cuadrantes (QPD) en donde se adquiere una señal que fluctúa de posición temporalmente [31, 39, 44, 47–49]. Asumiendo que los cambios de posición o fluctuaciones varían linealmente en la muestra y por lo tanto en el QPD, la señal adquirida es convertida a desplazamientos en (nm) dentro del plano de

la muestra y se puede obtener la amplitud de fluctuaciones de la membrana. Por último, para obtener los parámetros mecánicos, se obtiene la densidad de espectro de potencia (PSD) de la señal de fluctuación. Esto, junto con el ajuste de un modelo matemático de la membrana, permite la determinación de algunos parámetros mecánicos, como tensión de membrana, módulo de flexión y viscosidad efectiva.

## Modelo de fluctuación de membrana

Las membranas biológicas son de suma importancia para el correcto funcionamiento de las células vivas, ya que ellas son las responsables de establecer la frontera o barrera física entre los compartimentos intracelulares y el ambiente extracelular. Es en esta interfase donde las señales son transducidas [122], el material es tomado y liberado tanto por procesos activos como pasivos [123], y donde fuerzas mecánicas son realizadas entre la célula y su ambiente [124]. Para un correcto entendimiento de las células biológicas es necesario un entendimiento físico de la membrana celular de bicapa lipídica y su mecanismo, lo que ha motivado una gran cantidad de investigaciones. En sistemas de membrana bicapa como en multicapa, las medidas de las fluctuaciones dinámicas implican la derivación de parámetros mecánicos del sistema. Actualmente, es conocido que las propiedades mecánicas de la membrana bicapa, tales como el módulo de flexión  $\kappa$  y tensión  $\sigma$ , juegan un rol fundamental en gran cantidad de procesos celulares como movilidad, proliferación y endo/exocitosis. Generalmente, es aceptado que el módulo de flexión depende de la composición lipídica, mientras que la tensión es determinada por las fuerzas físicas presentes que experimenta la membrana, por ejemplo diferencias de presión osmótica.

En la actualidad, los liposomas artificiales compuestos de moléculas anfifílicas auto-organizadas en bicapas lipídicas cerradas son asumidos como modelos relevantes para caracterizar membranas biológicas. Dependiendo del método de formación, estos liposomas pueden ser de distintos tamaños, desde pequeñas vesículas unilamelares (SUV, radio de 100 – 500 nm) hasta vesículas unilamelares gigantes (GUV, radio hasta 100  $\mu\text{m}$ ). En el contexto biológico, es recomendado llamar a estas vesículas gigantes como liposomas, ya que el término vesícula está reservado para vesículas intracelulares del tamaño de las SUVs. Estos liposomas han sido usados como sistema modelo de membrana y para imitar células.

El entendimiento físico del mecanismo de los liposomas se basa en la suposición de una fase líquida cristalina que exhibe elasticidad de flexión. Esto fue usado por Helfrich para describir la energía libre necesaria para curvar y extender una membrana [118]. La teoría de Helfrich fue exitosamente usada para modelar las propiedades estáticas de las membranas, y durante las últimas tres décadas varios métodos experimentales han sido desarrollados para medir las propiedades mecánicas de membrana [125].

Un método consiste en medidas estáticas, como la aspiración por micropipeta, la cual fue introducida por Evans [125–129] o estiramiento de membrana mediante pinza óptica [125, 130, 131] la cual permite acceder a la dinámica de la membrana. Otra manera de obtener información del comportamiento dinámico de los contornos de células es mediante



el uso de la video microscopía [132, 133], la cual ha permitido la medición de la evolución de las fluctuaciones con una resolución temporal típica de 40 ms y espacial de 5 nm [133]. En estos estudios, el movimiento fuera del plano de la membrana es extraído directamente de las imágenes [125, 132–135]. Recientemente ha sido introducido un método óptico para medir fluctuaciones de membrana de glóbulos rojos con resoluciones espaciales del orden de los nanómetros (nm) y temporales típicamente en el rango  $10^{-4} - 10^{-5}$  s [31, 39, 44, 47], permitiendo cubrir una escala de frecuencias iguales o superiores a 10 kHz. La primera descripción teórica de la amplitud de fluctuación de una membrana y su dinámica fue desarrollada por Brochard y Lennon para el caso de membranas planas [136]. Este luego fue extendido a geometrías esféricas armónicas por Schneider et al. [137] y Milner y Safran [138], quienes incluyeron la tensión y la curvatura espontánea en la descripción esférica. La dinámica de membrana es descrita a través de una función de autocorrelación  $S(q; t)$  de los modos de excitación de la membrana, los cuales representan el curso del tiempo de relajación para un modo excitado de número de onda  $q$ .

La teoría clásica predice un decaimiento exponencial de la función de autocorrelación debido a la disipación de energía en el entorno líquido  $S(q; t) \propto e^{-\omega_q t}$  con una tasa de relajación para un modo de oscilación asociado a número de onda  $q$  dada por  $\omega_q = (\kappa q^3)/4\eta$ , donde  $\kappa$  representa el módulo de flexión o rigidez y  $\eta$  representa la viscosidad del medio. Otras fuentes de disipación como la fricción entre monocapas ha sido añadida posteriormente por Evans y Yeung [139] y Seifer y Langer [140], y han conllevado a una tasa de relajación que depende de  $q^2$ , en contraste con los procesos de relajación clásicos. Es importante notar que esta última fricción mencionada, es sólo esperado que sea significativa a altas curvaturas correspondientes a  $q > 10^7 \text{ m}^{-1}$ . Varios otros modelos han sido propuestos por Zilman y Granek para explicar las medidas experimentales de la función de decaimiento exponencial del estiramiento en la función del factor de estructura, como fue encontrado en estudios experimentales [141, 142]. Este modelo encaja bien para membranas semi-flexibles ( $\kappa > k_B T$ ) con pequeñas amplitudes de fluctuación. Un estudio experimental reciente investigó el decaimiento de modos de fluctuación directamente excitados en GUVs, y presentan una medición directa de los decaimientos exponenciales del estiramiento [130] dado por  $S(q; t) \propto e^{-\omega_q t^\alpha}$ , el cual no está en acuerdo con la teoría clásica de fluctuación de membrana. Mecanismos disipativos adicionales como la mencionada fricción entre monocapas o modos híbridos son evocados para explicar este comportamiento [130, 143–145]. Por todo lo anterior, la dinámica de las fluctuaciones de membrana continúa siendo un tema de investigación.

Aparte de estas descripciones habituales de la bicapa lipídica en términos del Hamiltoniano de Helfrich, existen descripciones más complejas derivadas de la teoría de cristal líquido smectic-A, las cuales han sido exitosamente aplicadas a membranas lipídicas de multicapas apiladas [146, 147]. El caso de membranas lipídicas de multicapa difiere del caso de bicapa única por la adición al módulo de curvatura de un módulo de compresión que actúa a lo largo de la estructura de la capa. Sin embargo, este módulo de compresión adicional es generalmente irrelevante en el contexto de membranas de bicapa única. En ambos casos, bicapa única y multicapas apiladas, la fricción entre monocapas es asumida

como el mecanismo disipador [140, 147], y no existe la disipación a través de entornos acuosos, mientras que resulta ser un término dominante para longitudes de onda larga en membranas de bicapa inmersas en agua.

Según los diversos trabajos mencionados anteriormente y, principalmente basados en las expresiones detalladas por Betz y su grupo de trabajo [31, 39, 44] para una membrana plana, la energía de fluctuación es descrita por un funcional de energía libre dado por  $F$  el cual es expresado como

$$F = \int dA \left[ \frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 h)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla h)^2 \right]. \quad (2.27)$$

En la ecuación 2.27,  $h$  es la extensión de la membrana desde su posición de equilibrio,  $\kappa$  el módulo de flexión,  $\sigma$  la tensión de la membrana, y la integral suma sobre toda la superficie. Usando el teorema de equipartición, la función de correlación de la fluctuación corresponde a

$$\langle h_{\mathbf{q}}^2 \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2}, \quad (2.28)$$

en donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura, y  $q$  el número de onda asociado a un modo de fluctuación. Si se considera la dinámica de relajación, y se resuelve la ecuación de Navier Stokes para una membrana impermeable, la frecuencia de relajación para un único modo excitado en una membrana impermeable se puede expresar como

$$\omega(q) = (\kappa q^3 + \sigma q)/4\eta, \quad (2.29)$$

en donde  $\eta$  representa la viscosidad media de los fluidos separados por la membrana. Una onda es entonces disipada por el medio y, a medida que el sistema se sobreamortigua, la amplitud decae exponencialmente, obteniéndose así una función de autocorrelación dependiente del tiempo descrita por

$$\langle h_q(t) h_q(0) \rangle = \langle h_q^2 \rangle e^{-\omega(q)t}. \quad (2.30)$$

Tomando la transformada de Fourier e integrando sobre todos los modos  $q$  accesibles, obtenemos la PSD para una membrana plana,

$$\begin{aligned} \text{PSD} &= \int_{q_{\text{mín}}}^{q_{\text{máx}}} \frac{d^2 \mathbf{q}}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \langle h_q(t) h_q(0) \rangle e^{i\omega t} dt \\ &= \frac{1}{\pi} \int_{q_{\text{mín}}}^{q_{\text{máx}}} q dq \langle h_q^2 \rangle \frac{\omega(q)}{\omega(q)^2 + \omega^2} \\ &= \frac{4\eta k_B T}{\pi} \int_{q_{\text{mín}}}^{q_{\text{máx}}} \frac{dq}{(\kappa q^3 + \sigma q)^2 + (4\eta\omega)^2}. \end{aligned} \quad (2.31)$$

En la ecuación 2.31,  $q_{\text{mín}}$  y  $q_{\text{máx}}$  corresponden a los números de onda de corte que, en la práctica, están asociados al perímetro de la membrana del objeto biológico bajo



estudio (asumiendo un objeto circular sería  $q_{\min} = 2\pi/2\pi r$ , con  $r$  el radio del objeto) y al diámetro  $d_f$  del haz enfocado ( $q_{\max} = 2\pi/d_f$ ), respectivamente. La integral sobre  $q$  en la ecuación 2.31 no puede ser expresada en forma analítica, sin embargo, se pueden obtener dos aproximaciones, una para altas y otra para bajas frecuencias, considerando una membrana infinita y un área de detección puntual ( $q_{\min} = 0$  y  $q_{\max} = \infty$ ). De esta manera, para cuando  $\omega \rightarrow 0$ , tenemos que

$$\begin{aligned} \text{PSD}_{\omega \rightarrow 0} &= \frac{k_B T}{2\sigma\omega} \\ &= \frac{k_B T}{2\sigma(2\pi f)}, \end{aligned} \quad (2.32)$$

y para  $\omega \rightarrow \infty$  tenemos que

$$\begin{aligned} \text{PSD}_{\omega \rightarrow \infty} &= \frac{k_B T}{6\pi(2\eta^2\kappa)^{1/3}\omega^{5/3}} \\ &= \frac{k_B T}{6\pi(2\eta^2\kappa)^{1/3}(2\pi f)^{5/3}}. \end{aligned} \quad (2.33)$$

Usando estas aproximaciones, podemos analizar de manera separada las fluctuaciones de la membrana. Si bien esta fue una de las técnicas desarrolladas en el actual trabajo, esta fue parte de la metodología destinada a alcanzar como objetivo principal el montaje de pinzas ópticas dobles para su uso con coordenada diferencial y uso de correlaciones. Es por esto que a continuación veremos los principales conceptos y detalles a considerar para la implementación de una herramienta de este tipo.

### 2.5.3. Pinzas ópticas dobles acopladas: uso de correlaciones y sus ventajas

Los principios y propiedades de la luz que permiten la manipulación de la materia son conocidos desde trabajos fundamentales que determinaron que la luz posee momentum lineal y angular, y que estos, pueden ser transferidos a partículas [148–150], lo cual, fue confirmado experimentalmente por trabajos posteriores [151, 152]. Sin embargo, fue con el surgimiento del láser y el trabajo de Ashkin [1, 2] que las pinzas ópticas de atrapamiento fuerte fueron creadas. Esta técnica, como ya se ha mencionado, permite múltiples aplicaciones en diferentes contextos tales como microfabricación y ordenamiento de partículas [5, 153–155], micro-reología de hidrodinámica de partículas coloidales [5, 156–160], termodinámica fuera del equilibrio [161–166], y particularmente, en biología para el estudio de moléculas únicas [5], entre otros. En este último caso, las pinzas ópticas pueden ser usadas como una herramienta cuantitativa para investigar sistemas microbiológicos al poseer la capacidad de ejercer fuerzas calibradas como también de medir fuerzas y desplazamientos. Sin embargo, esta herramienta ha tenido sus limitaciones, principalmente relacionados con la resolución espacio-temporal. En específico, ha sido un desafío alcanzar las sensibilidades para estudiar procesos moleculares en su escala espacio-temporal, las cuales varían

espacialmente desde los nanómetros hasta los Angstrom y temporalmente son procesos que se mueven en escalas de los segundos a milisegundos [5]. Esto último ha planteado desafíos resolutivos para la herramienta que han sido abordados en los últimos años, y han permitido el desarrollo de nuevos esquemas de pinzas ópticas fuertes como también de nuevas metodologías. En este sentido, se debe considerar que las fuerzas ópticas ejercidas por las pinzas de atrapamiento fuerte en general no permiten un atrapamiento estable de macromoléculas, pero sí de esferas dieléctricas [5]. Por la razón anterior, típicamente esferas con estas características son adheridas a los sistemas biológicos de estudio para poder manipularlos. Sin embargo, existen diferentes esquemas que han sido diseñados para poder realizar estos estudios. Generalmente, una esfera dieléctrica es adherida al extremo del sistema biológico, por lo que el otro extremo debe ser adherido a una superficie. Un segundo esquema es sostener el extremo libre mediante la succión de una micropipeta, y la tercera forma es adherir al extremo libre otra esfera, para lo cual es necesario un sistema de pinzas ópticas doble o dual, es decir, un sistema más sofisticado desde el punto de vista del diseño óptico. Un esquema de las tres situaciones planteadas es mostrado en la figura 2.3.

De acuerdo a lo mostrado en la figura 2.3, vemos que existen tres posibles esquemas con los cuales enfrentar estudios biológicos. Sin embargo, la capacidad de distinguir el fenómeno físico del ruido de la señal temporal adquirida será fundamental para hacer la elección correcta del esquema a utilizar. Para lo anterior, es necesario responder más en detalle el porqué es necesario mejorar la resolución espacial en pinzas ópticas desde un punto de vista de los desafíos biológicos. La respuesta a esto, es que muchos procesos biológicos fundamentales en la célula son de origen mecánico y ocurren mediante movimientos físicos discretos [5]. Algunos ejemplos de esto son los pasos de los motores moleculares como la kinesina [68] o los pasos con que motores moleculares empaquetan el ADN [67]. Las mediciones de tales movimientos discretos pueden entregar una lectura detallada de la cinética de tales sistemas siempre y cuando las mediciones de sus movimientos no sean oscurecidas por el ruido. Estas mediciones han logrado ser obtenidas con esquemas de pinzas ópticas tradicionales, pero muy pocas veces. Por ejemplo, el movimiento discreto de la kinesina o miosina ha podido ser detectado mediante un esquema de pinza óptica como el mostrado en la figura 2.3A. Las resoluciones alcanzadas con este esquema han mostrado que tiene la capacidad resolutiva de detectar pasos de unos pocos nanómetros con una diferencia temporal entre ellos de unas decenas de milisegundos [5], lo cual es suficiente para el estudio de motores moleculares [64, 66, 68]. En contraste, existen otros estudios más complejos, tales como los procesos de transcripción en donde se ha medido, mediante el esquema de pinzas ópticas dobles, que la RNA polimerasa da pasos de 3.7 Å a lo largo del ADN [113], es decir, entorno a la magnitud de un par de base. En este tipo de estudios, donde las exigencias resolutivas son altas, han sido utilizados tanto el esquema de pinza única con uso de micropipeta como las pinzas dobles [167], tal como es mostrado en figura 2.3B y figura 2.3C, respectivamente. Si bien ninguno de los esquemas mostrados en figura 2.3 está libre de ruidos, es importante analizar los ruidos a los cuales están sometidas cada una de estas geometrías. De acuerdo a lo anterior, se puede mencionar que las geometrías presentadas en la figura 2.3 están sujetas a ruidos que tienen relación

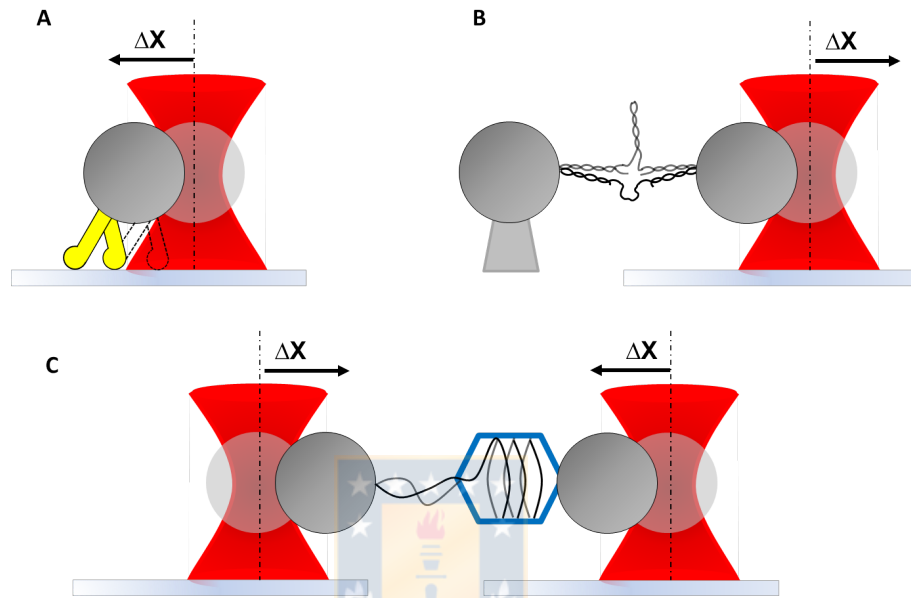


Figura 2.3: Diferentes esquemas para montaje de pinzas ópticas. **A** Pinza óptica única en el caso del estudio de la Kinesina y su desplazamiento. La Kinesina es adherida directamente a la esfera atrapada y el filamento es adherido a la superficie de la cámara de vidrio que contiene la muestra. Los desplazamientos de la esfera desde el centro de la trampa dan cuenta del desplazamiento de la Kinesina. **B** Esquema de pinzas ópticas usado para el estudio del estiramiento de hebra de ADN. Ambos extremos son adheridos a esferas funcionalizadas, pero una de las esferas es mantenida en su posición mediante la aspiración por micropipeta. El despliegue de las hebras de ADN nuevamente es observado por los desplazamientos de la esfera atrapada en el potencial óptico. **C** Esquema de pinzas ópticas fuertes duales o dobles. Ambos extremos del sistema biológico a estudiar, ejemplificado por un motor molecular de empaquetamiento de ADN, son atrapados mediante pinzas ópticas, en donde el empaquetado del ADN es revelado por la posición de ambas trampas. El movimiento relativo entre ambas trampas depende de la rigidez de cada una de ellas.

con perturbaciones provenientes del ambiente, fluctuaciones y deriva mecánica de las bases que sostienen la muestra, ruidos electrónicos y el ruido producido por el movimiento browniano que tiene la esfera atrapada debido a fuerzas de origen térmico provenientes del medio en el cual está suspendida. En geometrías en donde el segundo punto de unión es la cámara de la muestra como en figura 2.3A, se ha mostrado que es posible monitorear y corregir la deriva mecánica y las fluctuaciones del ambiente mediante la introducción de un segundo láser [5, 168, 169] en donde soluciones de este tipo también pueden ser aplicadas a geometrías tales como la mostrada en figura 2.3B. En contraste, geometrías de pinzas ópticas dobles, tales como la mostrada en la figura 2.3C, permiten aislar del instrumento la influencia de la mecánica de la cámara de la muestra, es decir, el sistema bajo estudio queda levitando [10–16, 113, 170]. Así, el sistema sólo queda sujeto a ruidos provenientes de cambios de índice de refracción del aire por pequeñas turbulencias y ruido atmosférico en general, los cuales deben y pueden ser minimizados. A pesar de las ventajas que puede mostrar cada uno de los esquemas de pinzas ópticas, aún se encuentra subyacente el ruido browniano. Sin embargo, es posible minimizar este ruido al analizar las señales de cada una de estas configuraciones mediante la obtención de una expresión del SNR en términos de los parámetros mecánicos y físicos representativos del sistema completo [5]. Es aquí donde las pinzas ópticas dobles cuentan con una característica única. La expresión del SNR para las pinzas ópticas, además de permitir su mejora mediante los parámetros físicos del sistema tal como las pinzas ópticas únicas, cuenta con una propiedad adicional, en donde las correlaciones de las posiciones entre las dos esferas atrapadas y unidas por un ligando, juegan un papel fundamental.

Una expresión del SNR ha sido derivada por Moffitt et al. [10] para una geometría de doble pinza óptica de atrapamiento fuerte, similar a lo hecho para una sola trampa óptica como la mostrada en la ecuación 2.26. Esto lo ha realizado basado en resultados de trabajos previos, como el de Abbondanzieri [113] que mostró las ventajas del uso de pinzas ópticas dobles para obtener mediciones ultra-estables al aislar a la muestra de las vibraciones mecánicas de la cámara que la contiene. Aquí, se utilizó una trampa estática de alta rigidez para reemplazar la adhesión a la superficie, y la otra trampa, para obtener las mediciones. Otro trabajo considerado fue el de Meiner y Quake [171], los cuales monitorearon la posición de dos esferas atrapadas con trampas de igual rigidez y unidas por una doble hebra de ADN. A partir de esto, sacaron provecho de las correlaciones entre las posiciones de ambas esferas para medir fuerzas con alta sensibilidad. Considerando lo anterior, Moffitt [10] indicó en su trabajo que la resolución espacial del instrumento de pinzas ópticas está dada por la proporción entre los cambios de posición medidos de la microesfera y la raíz cuadrática media de sus fluctuaciones. Utilizando lo anterior, encontró que existe una coordenada que explota las correlaciones entre las micro-esferas y que permite a la vez un incremento en la resolución espacial del instrumento. Además, encontró que con la elección correcta de parámetros y coordenadas, la resolución espacial es siempre mayor a la de pinzas ópticas únicas. Así, las predicciones realizadas fueron verificadas experimentalmente y la descripción técnica del montaje del instrumento presentadas en múltiples trabajos posteriores [10–16]. El detalle de este análisis de resolución espacial para pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, es presentado a continuación.

### Incremento de la sensibilidad en esquema de pinzas ópticas dobles

El movimiento de partes individuales de un sistema compuesto de dos partículas unidas está fuertemente correlacionado debido a la presencia del mecanismo de unión. Este movimiento individual correlacionado puede utilizarse para aumentar la resolución espacial en la determinación de la posición relativa de las partículas, lo cual ha sido probado teórica y experimentalmente [5, 10]. Por lo anterior, el montaje de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte es un esquema que permite obtener potencialmente la capacidad de adquirir con sensibilidad subnanométrica. En un análisis teórico y experimental realizado por Moffitt et al. [10], se mostró que la resolución espacial obtenida mediante la implementación de dos pinzas ópticas acopladas mejora de manera significativa cuando se le comparó con la obtenida con una única trampa, y en donde la resolución espacial está limitada por factores como la rigidez (stiffness) del mecanismo de unión, la rigidez de las trampas y la intensidad del ruido térmico, entre otros.

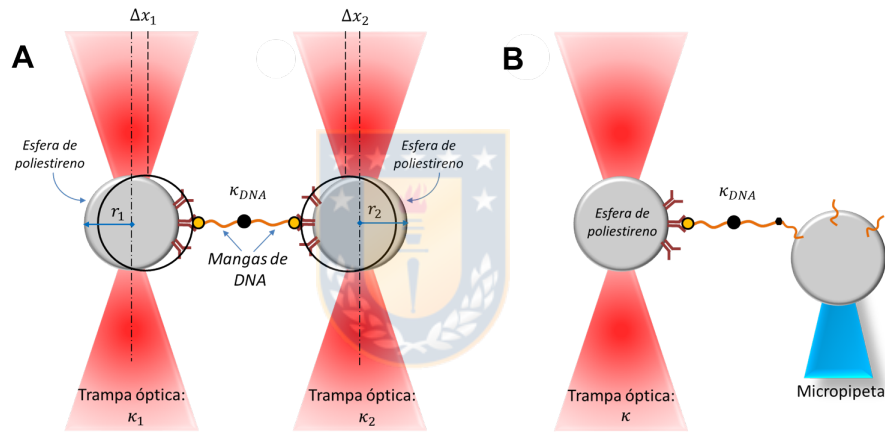


Figura 2.4: **A** Montaje de pinzas ópticas dobles, donde dos esferas de poliestireno son unidas a los extremos de un ADN y en donde una molécula única (círculo sólido) es unida a los extremos del ADN. **B** Montaje de pinza óptica única. Otra vez esferas de poliestireno son adheridas a los extremos de una hebra de ADN con una molécula única en los extremos del ADN (círculo sólido). En este caso, una de las esferas es atrapada por succión al cabezal de una micropipeta, por lo tanto, solo una de las esferas puede moverse debido al ruido térmico. Fuente de imagen: elaboración propia.

Considerando la figura 2.4A, la relación señal a ruido térmica para un sistema que consiste de una trampa óptica con constante de rigidez  $\bar{\kappa}_1$  unida a través de una hebra de ADN a una segunda trampa óptica con constante de rigidez  $\bar{\kappa}_2$ , es

$$\begin{aligned}
\text{SNR}_1 &\equiv \frac{\langle \Delta x_1 \rangle}{\sqrt{\langle x_1^2 \rangle_B}} \\
&= \frac{\kappa_{\text{ADN}} \Delta L}{\sqrt{4k_B T B}} \sqrt{\left(1 - \frac{\gamma_1 \gamma_2}{\Gamma^2}\right)} \\
&\times \frac{\bar{\kappa}_2}{\sqrt{\gamma_1 (\bar{\kappa}_2 + \kappa_{\text{ADN}})^2 + \gamma_2 \kappa_{\text{ADN}}^2 - 2 \frac{\gamma_1 \gamma_2}{\Gamma} \kappa_{\text{ADN}} (\bar{\kappa}_2 + \kappa_{\text{ADN}})}}, \tag{2.34}
\end{aligned}$$

donde  $\langle \Delta x_1 \rangle$  es la posición media de la microesfera atrapada con radio  $r_1$  sujeto a fluctuaciones térmicas, es decir, movimiento browniano,  $\kappa_{\text{ADN}}$  es la constante de rigidez del ADN,  $\Delta L$  es el cambio de longitud introducido en la hebra de ADN,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura,  $B$  es el ancho de banda en frecuencia de la adquisición, correspondiente a la mitad de la tasa a la que se recopilan los datos experimentales,  $\gamma_{1,2}$  es el coeficiente de arrastre de la microesfera 1 y 2 respectivamente y  $\Gamma$  es el tiempo en que el fluido se propaga entre una microesfera a la otra debido a sus fluctuaciones brownianas intrínsecas [10]. La expresión para  $\text{SNR}_2$  es encontrada mediante el intercambio de índices  $1 \rightarrow 2$ .  $\text{SNR}_1$  ayuda a deducir la ecuación para el SNR en un sistema de trampa óptica única al hacer la aproximación  $\bar{\kappa}_2 \rightarrow \infty$ , o equivalentemente en la práctica, cuando una de las microesferas, como es mostrado en la figura 2.4B, es sujeta firmemente por una micropipeta. En esta situación el SNR es

$$\text{SNR}_{\text{single}} = \frac{\kappa_{\text{ADN}} \Delta L}{\sqrt{4k_B T B} \gamma_1} \sqrt{\left(1 - \frac{\gamma_1 \gamma_2}{\Gamma^2}\right)}. \tag{2.35}$$

La cantidad  $\text{SNR}_{\text{single}}$  corresponde a la expresión del SNR para una trampa única (no ligada a la otra) como se muestra en la 2.4B. Sin embargo, si una correlación de coordenadas es realizada mediante la combinación lineal de las coordenadas de posición  $x_1$  (trampa 1) y  $x_2$  (trampa 2), en particular  $x_- = x_1 - x_2$ , se puede calcular un SNR diferencial  $\text{SNR}_{\text{diff}} = \langle \Delta x_- \rangle / \sqrt{\langle x_-^2 \rangle_B}$  con  $\langle x_-^2 \rangle_B = \langle x_1^2 \rangle_B + \langle x_2^2 \rangle_B - 2 \langle x_1 x_2 \rangle_B$  y  $\langle \Delta x_- \rangle = \langle \Delta x_1 \rangle - \langle \Delta x_2 \rangle$ . El acoplamiento entre las esferas atrapadas debido al ADN que las une u otro elemento biológico que lo hiciera, permite que exista una correlación positiva  $\langle x_1 x_2 \rangle_B$  entre las posiciones de las esferas lo cual permite una mejora en el  $\text{SNR}_{\text{diff}}$ . De lo anterior, se puede calcular un valor óptimo para el  $\text{SNR}_{\text{diff}}$ , el cual es

$$\text{SNR}_{\text{opt}} = \frac{\kappa_{\text{ADN}} \Delta L}{\sqrt{4k_B T B} \gamma_{\text{eff}}} \sqrt{\left(1 - 2 \frac{\gamma_{\text{eff}}}{\Gamma}\right)}, \tag{2.36}$$

en donde se ha usado  $\gamma_{\text{eff}} = \gamma_1 \gamma_2 / (\gamma_1 + \gamma_2)$  y se encuentra un valor óptimo para el  $\text{SNR}_{\text{diff}}$  bajo la condición  $\bar{\kappa}_2 / \bar{\kappa}_1 = (\gamma_2 / \gamma_1) (1 - \gamma_1 / \Gamma) / (1 - \gamma_2 / \Gamma)$ . Finalmente, la siguiente desigualdad es válida

$$\text{SNR}_{\text{opt}} \geq \text{SNR}_{\text{single}} \geq \text{SNR}_1. \tag{2.37}$$

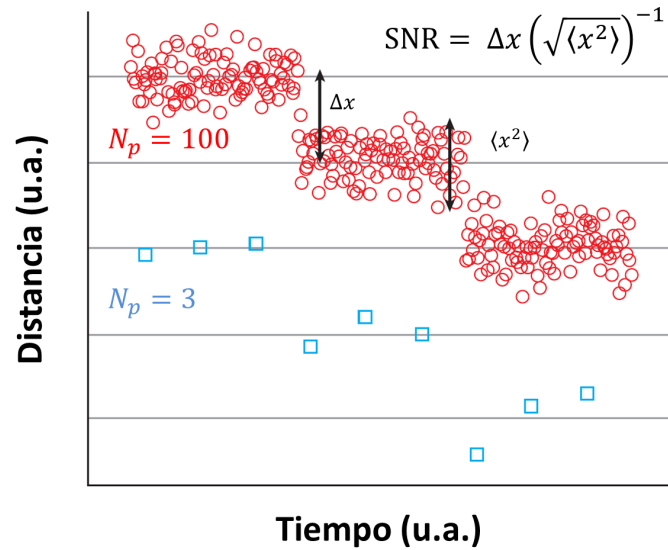


Figura 2.5: Señales de distancia en función del tiempo que representan la medición de pasos de un sistema biológico capturado mediante una pinzas ópticas. La señal representada por círculos rojos cuenta con  $N_p = 100$  muestras independientes que conforman cada paso y la señal representada por cuadrados azules, con  $N_p = 3$ . Se muestra, además, una manera gráfica de cómo obtener experimentalmente el SNR de una señal biológica, la cual será extraída al hacer la proporción entre la distancia media entre los pasos y el ruido de cada paso. Imagen extraída desde [5].

Esta última expresión, significa que el SNR en una sistema de pinzas ópticas dobles acopladas es más grande comparada al de un sistema de trampa única si es que una correlación de coordenadas de las posiciones de ambas trampas es realizada.

Adicionalmente, y desde un punto de vista experimental, el SNR planteado en este análisis para las señales en pinzas ópticas dobles puede ser extraído considerando la representación mostrada en la figura 2.5 la cual fue tomada desde [5], en donde se muestran dos señales de distancia en función del tiempo, una indicada por círculos rojos y la otra por cuadrados azules. Ambas señales pueden representar, por ejemplo, los pasos dados al estirar una hebra de ADN, los cuales, se reflejan en los escalones. La diferencia entre ambas señales se da en la cantidad de puntos con que están conformadas. La señal de círculos rojos tiene pasos conformados por una cantidad  $N_p = 100$  y la de cuadrados  $N_p = 3$ , sin embargo, ambas cuentan con un  $SNR = 4$ . Se debe tener en cuenta que los puntos que conforman los pasos en las señales son puntos descorrelacionados, es decir, medidas independientes en el tiempo. Por lo anterior, la relación señal a ruido (SNR) para un paso puede ser calculada a partir de la proporción de la distancia media entre los pasos,  $\Delta x$ , y el ruido en un paso dado  $\sqrt{\langle x^2 \rangle}$ , tal como lo muestra la figura. Por último, si bien ambas señales tiene el mismo SNR, el análisis de ruido estará determinado por el número de puntos  $N_p$  no correlacionados que conforman el paso, tal como se indica en la figura.



# Capítulo 3

## Experimentos implementados en biología

En este capítulo, son descritos los montajes experimentales implementados en este trabajo, los cuales, fueron utilizados en escenarios biológicos y de caracterización instrumental. La instrumentación desarrollada tiene relación con el montaje de pinzas ópticas débiles para la aplicación de la técnica TRMFS en configuración de pinza única y doble, y además, con el desarrollo de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. Sin embargo, es necesario indicar algunos conceptos previos relevantes que son comunes a toda la instrumentación desarrollada. Cada uno de estos temas son tratados en detalle en las siguientes secciones.

### 3.1. Conceptos experimentales previos

Múltiples conceptos de óptica se encuentran involucrados en la implementación de herramientas de pinzas óptica. Si bien en este trabajo son presentadas técnicas asociadas tanto a TRMFS y pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, existen conceptos comunes en sus implementaciones que deben ser revisados. A continuación, los conceptos mas relevantes serán descritos.

#### 3.1.1. Planos conjugados en implementación de pinzas ópticas

Los planos conjugados en un sistema óptico de pinzas ópticas son considerados un aspecto fundamental en el diseño de estas cualquiera sea su aplicación. Se dice que dos planos dentro de un sistema óptico son *planos conjugados* si la distribución de intensidad en un plano es una imagen de la distribución de intensidad en el otro plano. Del mismo modo, se dice que dos puntos son puntos conjugados si uno es la imagen del otro [172]. En este sentido, deflexiones angulares producidas en un plano producirán cambios angulares en el plano imagen, es decir, en su plano conjugado. Esta afirmación puede ser confirmada si hacemos un análisis basado en óptica de matrices de transferencia [173] sobre un sistema de particular interés que es típicamente utilizado en instrumentación de pinzas ópticas, el cual



se conforma por dos lentes convergentes que toman la luz procedente de un plano objeto y forman una imagen en otro plano, es decir, son capaces de producir planos conjugados [4, 10–16, 70, 174–182]. Por lo anterior, considere un plano objeto desde donde emerge un haz con un ángulo  $\theta_1$  desde una coordenada  $y_1$  y que se encuentra a una distancia  $f_1$  de un lente  $L_1$  de focal  $f_1$ . A su vez, el lente  $L_1$  está a una distancia  $f_1 + f_2$  de un segundo lente  $L_2$  con focal  $f_2$  el cual se encuentra a una distancia  $f_2$  de un plano imagen desde donde emerge un haz con un ángulo  $\theta_2$  desde una coordenada  $y_2$ . Esta situación es mostrada en la figura 3.1.

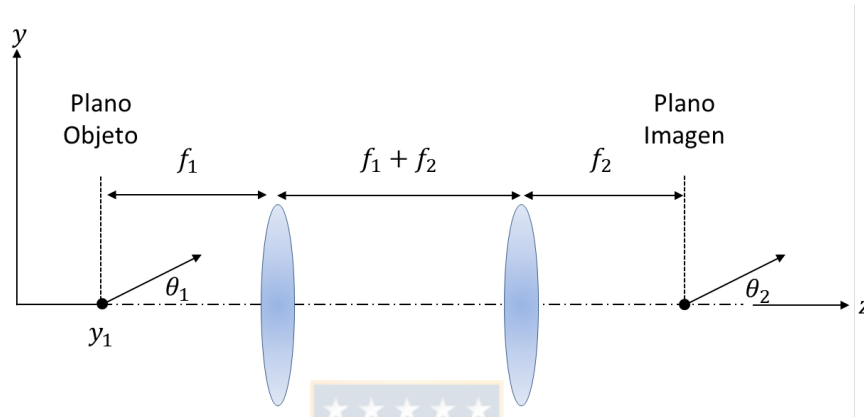


Figura 3.1: Esquema de un sistema de componentes ópticos en donde se transfieren rayos ópticos entre dos planos conjugados, el plano objeto y el plano imagen.

El sistema de la figura 3.1, llamado también sistema telescópico, permite producir magnificación, demagnificación o mantención del diámetro entre un plano objeto y uno imagen en función de la elección de sus focales. Esto es relevante por ejemplo para sistemas en donde se utiliza haz láser correctamente colimado. Otro aspecto relevante de este sistema, es que permite conformar dos planos con correspondencia entre los puntos de ambos planos considerados, es decir, se dice que el plano objeto con el plano imagen están conjugados. Lo anterior se relaciona con que deflexiones de la luz proveniente desde el punto objeto se verán reflejadas en deflexiones en el plano imagen. El análisis de este sistema óptico en términos de la relación entre las coordenadas espaciales y angulares de entrada y salida es realizado mediante óptica matricial, en donde se consideran las matrices de espacio libre y la matriz de transferencia de una lente delgada. Con lo anterior, se puede calcular una matriz de transferencia total del sistema. Consideremos entonces la definición de la matriz de espacio libre  $M_{EL}$  como

$$M_{EL} = \begin{bmatrix} 1 & d \\ 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (3.1)$$

en donde  $d$  es la distancia desde el plano objeto al primer lente. Por su parte, la matriz

de transferencia de una lente delgada  $M_{LD}$  es la descrita por

$$M_{LD} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f} & 1 \end{bmatrix}. \quad (3.2)$$

En la ecuación 3.2,  $f$  es la focal de la lente por donde son transferidos los rayos de luz incidente. Para calcular la matriz de transferencia utilizando las expresiones de 3.1 y 3.2, se debe identificar claramente el camino óptico que siguen los rayos en el sistema de la figura 3.1. Respecto a esta, la fuente lumínica posicionada a una distancia  $f_1$  de la primera lente, emerge desde la altura  $y_1$  con un ángulo  $\theta_1$ . Los rayos que viajan por el espacio libre, luego se transferirán a través de un lente de focal  $f_1$ , viajando nuevamente por el espacio libre una distancia  $f_1 + f_2$ , para luego ser transferidos por una lente de focal  $f_2$  y viajar por el espacio libre hasta el plano imagen, plano que está conjugado con el plano objeto. Por lo anterior, la transferencia de los rayos por el sistema de la figura 3.1 puede ser representada por una cascada de matrices de elementos ópticos y espacio libre tal como es representado en la figura 3.2 siguiendo las reglas de operación de la óptica de rayos matricial [173].

$$M_T = \begin{array}{c} \boxed{M_{EL}} \\ d = f_2 \end{array} \times \begin{array}{c} \boxed{M_{LD}} \\ L_2 \text{ de Focal } f_2 \end{array} \times \begin{array}{c} \boxed{M_{EL}} \\ d = f_1 + f_2 \end{array} \times \begin{array}{c} \boxed{M_{LD}} \\ L_1 \text{ de Focal } f_1 \end{array} \times \begin{array}{c} \boxed{M_{EL}} \\ d = f_1 \end{array}$$

Figura 3.2: Esquema para la obtención de una matriz de transferencia total  $M_T$  para el sistema de figura 3.1 en donde  $M_{LD}$  es la matriz de transferencia para una lente delgada y  $M_{EL}$  la del espacio libre. Cada caja indica su matriz de transferencia asociada, en donde se indica la distancia  $d$  de cada espacio libre que viaja el haz para el caso de la matriz  $M_{EL}$  y la focal  $f$  asociada a la matriz de lente delgada para lentes  $L_1$  y  $L_2$ .

La operación matricial mostrada en la figura 3.2, indica cómo obtener la matriz de transferencia total  $M_T$  para el sistema de figura 3.1, en donde  $M_{LD}$  es la matriz de transferencia para una lente delgada y  $M_{EL}$  la del espacio libre. Cada caja indica su matriz de transferencia asociada, en donde se indica la distancia  $d$  de cada espacio libre que viaja el haz para el caso de la matriz  $M_{EL}$  y la focal  $f$  asociada a la matriz de lente delgada para lentes  $L_1$  y  $L_2$ . La expresión explícita de esta operación es representada por

$$M_T = \begin{bmatrix} 1 & f_2 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_2} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & f_1 + f_2 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_1} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & f_1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (3.3)$$

lo cual nos entrega como resultado una matriz de transferencia total  $M_T$  como la expresada en la ecuación

$$M_T = \begin{bmatrix} -\frac{f_2}{f_1} & 0 \\ 0 & -\frac{f_1}{f_2} \end{bmatrix}. \quad (3.4)$$

Con este resultado debemos encontrar la relación entre las coordenadas espaciales y angulares de entrada y salida del sistema. Para esto usamos consideraciones de óptica paraxial. Cuando los ángulos son muy pequeños, entonces podemos relacionar los parámetros de entrada y salida del sistema de la figura 3.1 de manera lineal, tal como se muestra a continuación mediante

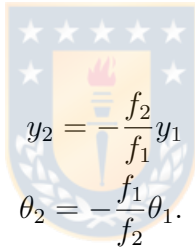
$$y_2 = Ay_1 + B\theta_1 \quad (3.5)$$

$$\theta_2 = Cy_1 + D\theta_1, \quad (3.6)$$

en donde A, B, C, y D, son números reales. Este sistema de ecuaciones puede ser representado de manera conveniente en forma matricial tal como es expresado en

$$\begin{bmatrix} y_2 \\ \theta_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} \begin{bmatrix} y_1 \\ \theta_1 \end{bmatrix}. \quad (3.7)$$

Entonces, la matriz  $M$  cuyos elementos son A, B, C, y D, es la matriz que caracteriza el sistema óptico que ya se ha calculado como  $M_T$ , permitiendo determinar  $(y_2, \theta_2)$  a partir de  $(y_1, \theta_1)$ . Utilizando entonces las ecuaciones 3.4 y 3.7, es posible obtener que las relaciones finales entre  $(y_2, \theta_2)$  y  $(y_1, \theta_1)$  son



$$y_2 = -\frac{f_2}{f_1}y_1 \quad y \quad (3.8)$$

$$\theta_2 = -\frac{f_1}{f_2}\theta_1. \quad (3.9)$$

Estas relaciones nos entregan como resultado que si tenemos un objeto de un tamaño en el plano del objeto, en el plano imagen o conjugado del objeto, este tendrá un menor tamaño si el sistema de dos lentes delgadas es un telescopio reductor, es decir, si se considera  $f_2 < f_1$ . Por su parte, la relación entre los ángulos muestra que si consideramos nuevamente la condición para un telescopio reductor, el ángulo de salida se verá amplificado respecto a la variación angular realizada en el plano imagen. Si el telescopio fuera magnificador, entonces tendríamos el caso contrario y si fuera un sistema telescópico X1 entonces no habría variaciones excepto la inversión de la imagen igual que para todos los otros casos.

### 3.1.2. Uso de planos conjugados para desplazamientos de haces en pinzas ópticas

Una capacidad fundamental en pinza ópticas es poder desplazar la trampa óptica de manera transversal dentro del plano de atrapamiento y al mismo tiempo conservar su fuerza. En la práctica, esto es necesario para interrogar a los sistemas biológicos estudiados mediante la aplicación de pequeñas magnitudes de fuerza sobre ellos magnitudes para que revelen su mecánica. Experimentalmente, el desafío de desplazar las trampas dentro

del plano de la muestra con la mayor estabilidad mecánica posible ha sido enfrentado de manera extensiva en muchos trabajos [4, 10–16, 70, 174–182]. Para lograr este objetivo, es necesario rotar la dirección del láser de atrapamiento entorno al plano focal trasero (BFP, por sus siglas en inglés) del lente objetivo que genera la trampa, el cual consideraremos infinito corregido. Esto se puede realizar típicamente al utilizar un sistema telescópico que permita rotar la dirección del haz desde un plano conjugado del BFP del lente de atrapamiento, es decir, desde el plano en donde estará el elemento redireccionador de haz [182], tal como el planteado en figura 3.1. Una forma simple y muy utilizada para redireccionar el haz es el uso de espejos con monturas ajustables, como por ejemplo espejos piezoeléctricos. Este espejo con montura ajustable es posicionado en el plano conjugado del BFP del lente objetivo mediante el uso del sistema telescópico conformado por dos lentes convergentes. Entonces, un cambio en el ángulo del haz desde el espejo ajustable, y por lo tanto un cambio en el ángulo en el BFP del lente objetivo, producirá movimientos laterales de la trampa en el plano de la muestra [182]. Si bien el uso de espejos con monturas ajustables son comúnmente usados, otras alternativas son consideradas para evitar limitaciones mecánicas y de velocidad de desplazamientos del barrido del haz. Estas alternativas se relacionan con deflectores acusto-ópticos y elementos difractivos como moduladores espaciales de luz. El esquema completo para desplazamientos de haz es mostrado en tres diferentes versiones en la figura 3.3. La figura 3.3A muestra un sistema desplazador de trampas con elección de un sistema telescópico  $4f$ , es decir, un sistema en donde ambos lentes cuentan con la misma focal  $f$ . Esto permite que el haz rote entorno al BFP del lente objetivo sin cambiar de tamaño el diámetro del haz láser entre planos conjugados. A diferencia de esta elección, sistemas telescópicos de focales arbitrarias pueden ser escogidos, tal como en las figuras 3.3B y 3.3C. Estos esquemas permiten hacer un breve análisis de las consecuencias de variar el esquema telescópico de la figura 3.3A. En primer lugar, la elección de focales diferentes  $f_1$  y  $f_2$  tendrá como consecuencia que el diámetro del haz redireccionado desde el plano del espejo ajustable, cambie su magnitud cuando llegue a su plano conjugado en el BFP del lente objetivo. Lo anterior, es debido a que estos tipos de sistemas telescópicos tiene una magnificación dada por  $M = -f_2/f_1$  [183]. Por lo tanto, dependiendo de los valores de las focales escogidas, se producirá un aumento o disminución del diámetro del haz. Además, como puede ser observado a partir de las ecuaciones 3.8 y 3.9, tendrá consecuencias en los cambios angulares producidos en el BFP del lente objetivo y por lo tanto, en el rango de desplazamiento lateral posible en el plano de la muestra. Lo anterior, es mostrado en la figura 3.3B y en la figura 3.3C. En estas, se muestran sistemas telescópicos generales alternativos que pueden ser usados para desplazamientos de trampas en el plano de la muestra. El sistema de la figura 3.3B cuenta con lentes  $L_1$  y  $L_2$  en donde la focal  $f_2$  es mayor a  $f_1$ . Por su parte, el sistema de la figura 3.3C, cuenta con lentes  $L_1$  y  $L_2$  en donde la focal  $f_2$  es menor a  $f_1$ . La consecuencia de lo anterior es que, para el sistema de la figura 3.3B, el diámetro del haz de salida  $D_2$  será mayor al de entrada  $D_1$ , y en el de la figura 3.3C, el diámetro  $D_2$  será menor que  $D_1$ . Dadas las arquitecturas de las figuras 3.3B y 3.3C, el desplazamiento lateral  $d_{f_2 > f_1}$  de las trampas en el sistema de la figura 3.3B será menor en comparación al que se puede lograr en el sistema de la figura 3.3C denominado  $d_{f_2 < f_1}$ . Esto se debe a la elección de las distancias focales de las lentes de los sistemas. Por último, en la figura 3.3 se han indicado con (\*) los planos que están conjugados en cada

uno los sistemas telescópicos presentados.

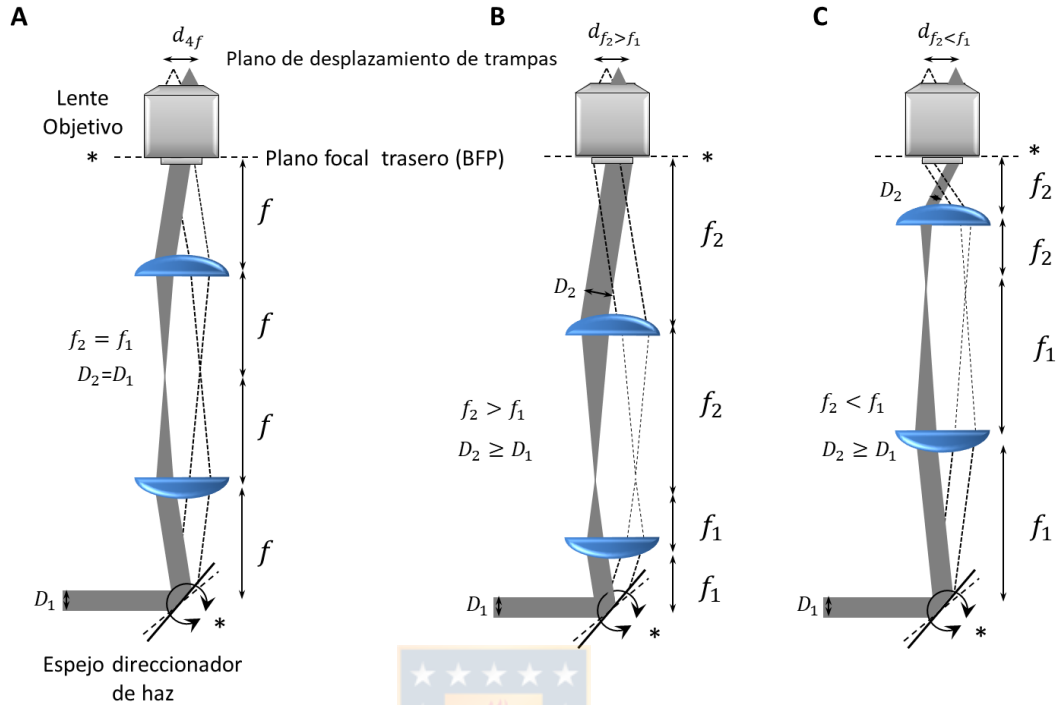


Figura 3.3: Uso de sistemas telescópicos en instrumentación basada en esquema de pinzas ópticas para el desplazamiento lateral de trampas en el plano de la muestra. **A** Sistema telescópico típico utilizado en pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte para el desplazamiento de una de las trampas por medio de un espejo que redirecciona el haz (espejo piezoeléctrico) en un plano conjugado del plano focal trasero del lente objetivo que genera la trampa [10–16]. **B** y **C** muestran sistemas telescópicos generales alternativos que pueden ser usados para desplazamientos de trampas en el plano de la muestra. El sistema **B** cuenta con lentes  $L_1$  y  $L_2$  en donde la focal  $f_2$  es mayor a  $f_1$ . Por su parte, el **C** cuenta con lentes  $L_1$  y  $L_2$  en donde la focal  $f_2$  es menor a  $f_1$ . La consecuencia de lo anterior es que, para el sistema **B**, el diámetro del haz de salida  $D_2$  será mayor al de entrada  $D_1$ , y en **C**, el diámetro  $D_2$  será menor que  $D_1$ . Dadas las arquitecturas de **B** y **C**, el desplazamiento lateral de las trampas en **B** será menor al de **C** ( $d_{f_2 > f_1} < d_{f_2 < f_1}$ ) debido a la elección de las distancias focales de las lentes de los sistemas. Para todos los sistemas telescópicos mostrados se han indicado con (\*) los planos que están conjugados. La figura es una modificación de la presentada en [182].

### 3.1.3. Interferometría de plano focal trasero: BFPI

Técnicas de mediciones de alta resolución espacial y temporal son deseables para cualquier instrumento basado en esquemas de pinzas ópticas para la detección de movimientos o desplazamientos de sistema biológicos. Este es el caso de la detección de posición de objetos esféricos atrapados en el caso de trampas ópticas única y duales [4, 5, 10] como

también en estudios de fluctuación de membrana lipídicas de células [31,39,48,49]. Existen variados métodos para la detección de este tipo de desplazamientos [4,47]. Sin embargo, hay una técnica comúnmente usada denominada interferometría de plano focal trasero [71,72] (BFPI por sus siglas en inglés), donde existen varios ejemplos de aplicaciones en estudios relevantes [4,10,70,113,170] y que es capaz de entregar la sensibilidad y ancho de banda necesarios para aplicaciones de alta resolución [12]. La técnica de BFPI se basa en la dependencia de la posición de una partícula en el foco de un láser enfocado por un lente objetivo y la posición del patrón de interferencia que se produce en el plano focal trasero (BFP, por sus siglas en inglés) de un lente objetivo colimador (plano de Fourier de un plano focal). Este patrón se produce por la luz dispersada hacia adelante por el objeto y la luz transmitida que no ha sido dispersada [184]. Esta misma implementación permite detectar movimientos axiales basado en los cambios de la distribución radial del patrón producido en el BFP del lente colimador [12]. Para sistemas de pinzas ópticas, esta técnica funciona típicamente en conjunto con un sistema telescópico para desplazamiento de trampas como los descritos en la figura 3.3 [4,10]. Lo anterior, le entrega propiedades únicas, tales como, capacidades de detección de desplazamiento biaxial independiente de la posición del foco del láser en donde se encuentra el objeto a detectar en el plano de la muestra y compatibilidad con configuraciones de trampa múltiples [10,70,113].

A modo de ejemplo, en la figura 3.4 se muestra un esquema de implementación típica de la técnica de BFPI en instrumentación de pinzas ópticas [4,10,12,70,72]. Esta es una combinación de sistemas ópticos. El primero es un sistema telescópico para desplazamiento de haz en el plano de la muestra de un sistema de pinzas ópticas, como los mostrados en la figura 3.3. Está compuesto de un espejo piezoeléctrico EP, un lente  $L_1$  de focal  $f_1$  y un espejo  $L_2$  de focal  $f_2$ . Los planos de EP y el del plano focal trasero  $BFP_{LOT}$  del lente objetivo de atrapamiento LOT están conjugados. Rotaciones de EP generan diferentes entradas angulares en  $BFP_{LOT}$  y como consecuencia, movimientos laterales del haz enfocado en el plano de la muestra. Sin embargo, la distribución de intensidad será estacionaria en el plano  $BFP_{LOT}$  pues este se encuentra conjugado con el plano EP. El segundo sistema es el que permite medir la posición de un objeto en pinzas ópticas y está compuesto por el lente LOT ya mencionado, un lente condensador LC, un lente convergente  $L_3$  y un fotosensor de posiciones de cuatro cuadrantes QPD. La combinación de ambos sistemas posibilitan la implementación de la técnica de BFPI. Para ejemplificar su funcionamiento, considere el caso de una pinza óptica de atrapamiento fuerte. La luz que ingresa por LOT enfocará el haz de manera que atraparé un objeto, por ejemplo, una esfera de poliestireno. La luz emergiendo desde el foco entonces será colectada por un lente colimador LC. Esta luz formará una patrón de interferencia en el plano focal trasero  $BFP_{LC}$  de LC debido a la interferencia entre la luz dispersada y no dispersada por la esfera. Considere, además, que  $BFP_{LOT}$  y  $BFP_{LC}$  se encuentran conjugados. Si la posición de la esfera atrapada cambia respecto al centro de la trampa, entonces la distribución de intensidad de la interferencia en el  $BFP_{LC}$  sufrirá cambios. Dada la accesibilidad limitada de este último plano, se utiliza un lente  $L_3$  para generar un plano conjugado del  $BFP_{LC}$  y de esta manera monitorear los cambios de intensidad mediante un fotosensor de posición QPD posicionado en ese lugar. La figura 3.4 indica un lente  $L_3$  posicionado a una distancia  $a$  del plano  $BFP_{LC}$  y el plano

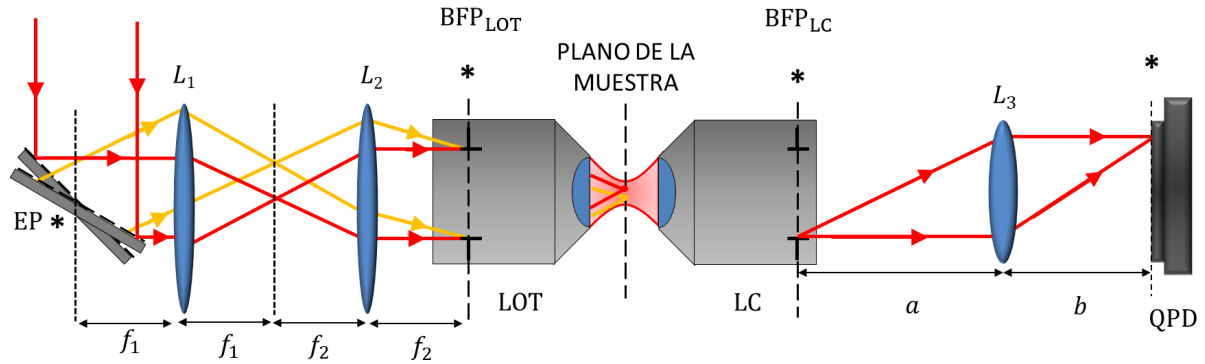


Figura 3.4: Esquema representativo de la técnica de interferometría de plano focal trasero (BFPI, por sus siglas en inglés). Un espejo piezoeléctrico EP junto a un sistema telescópico compuesto de un lente  $L_1$  de focal  $f_1$  y un lente  $f_2$  de focal  $f_2$ , permiten movimientos angulares en el plano focal trasero  $BFP_{LOT}$  del lente de atrapamiento LOT que se traducen en desplazamientos laterales del láser enfocado en el plano de la muestra. Dado que los planos de EP y  $BFP_{LOT}$  están conjugados, la distribución de intensidad en el plano  $BFP_{LOT}$  es estacionaria, independiente de los movimientos angulares. Por su parte, dos lentes objetivos son posicionados luego de EP y el sistema telescópico. Estos lentes, el lente objetivo de atrapamiento LOT y un lente colimador LC, son puestos de manera que  $BFP_{LOT}$  y el plano focal trasero  $BFP_{LC}$  del lente LC están conjugados. Considerando el caso de una pinza óptica de atrapamiento fuerte, LC colecta la luz proveniente del foco en donde se encuentra un objeto atrapado por una trampa óptica generada por LOT. La luz dispersada y no dispersada por el objeto en el foco generan un patrón de interferencia en el plano  $BFP_{LC}$ . Cambios en la posición del objeto en el foco respecto al centro de la trampa generará cambios en la distribución de intensidad de la interferencia. Para observar el plano  $BFP_{LC}$  se forma un plano conjugado de este mediante el uso de una lente  $L_3$ . Este lente se coloca a una distancia  $a$  de  $BFP_{LC}$  y el plano conjugado de este último se forma a una distancia  $b$  del lente. En ese plano conjugado es colocado un fotosensor de posición QPD. Cambios en la posición del objeto respecto del centro de la trampa óptica en el plano de la muestra, producirá cambios en la distribución del patrón de intensidad de la interferencia que podrán ser detectados en el QPD, independiente de los movimientos laterales de la trampa en el plano de la muestra. Todos los planos conjugados están indicados por (\*). Imagen es el resultado de una modificación de representaciones existentes [70, 176].



conjugado de este plano es formado a una distancia  $b$  del lente. Como consecuencia de que los planos del QPD, el  $\text{BFP}_{\text{LC}}$ , el  $\text{BFP}_{\text{LOT}}$  y el de EP se encuentran ahora conjugados, el QPD sólo detectará los cambios de intensidad del patrón de interferencia producidos por los movimientos de la esfera dentro de la trampa y no por desplazamientos laterales de la trampa en el plano de la muestra [4, 10, 12, 70, 71]. En específico, la insensibilidad a los desplazamientos laterales de la trampa debido al sistema desplazador del telescopio se deberá a que la distribución de intensidad en  $\text{BFP}_{\text{LOT}}$  es estática, es decir, independiente de los cambios angulares de la luz en ese plano y que desplaza la trampa en el plano de la muestra. Dado que el  $\text{BFP}_{\text{LOT}}$  está conjugado con el  $\text{BFP}_{\text{LC}}$ , el patrón de intensidad en este último sólo cambiará por efectos producidos por una esfera atrapada y sus movimientos dentro de la trampa. Finalmente, como el QPD se encuentra en un plano conjugado del  $\text{BFP}_{\text{LC}}$ , entonces la insensibilidad a los desplazamientos laterales de la trampa también se verá reflejada en las mediciones realizadas por este sensor de posición. Por claridad, todos los planos conjugados en la figura 3.4 han sido indicados con (\*).

Sistemas de detecciones de posición de alta resolución similares han sido implementadas para la detección de la posición de membranas celulares en los que esquemas de pinzas ópticas son utilizados. En este contexto, se ha desarrollado un trabajo fundamental con una técnica interferométrica para estudiar y medir el movimiento de las membranas lipídicas con resolución espacial nanométrica y temporal de microsegundos [50] la que ha sido implementada como base de estudios de espectroscopía de fluctuación de membrana (TRMFS, por sus siglas en inglés) [31, 39, 48, 49]. Los principios y elementos fundamentales de este esquema de detección de fluctuación de membranas son similares a los usados en BFPI, siendo su principal diferencia que la técnica de medición de fluctuación de membrana trabaja en esquemas de pinzas ópticas con regímenes de potencias débiles, es decir, sin atrapar. La técnica funciona posicionando un láser enfocado de baja potencia sobre el borde de la membrana celular fluctuando por motivos térmicos y metabólicos. Entonces, se colecta la luz que se dispersa hacia adelante mediante un lente colimador. En el BFP de este lente se formará un patrón de interferencia debido a la mayor o menor fluctuación de la membrana. Un fotosensor de posición QPD para detectar las fluctuaciones es colocado entonces en un plano conjugado del BFP del lente condensador, es decir, en donde se forma una imagen de este. Además, para que este sistema funcione y pueda ser calibrado, típicamente trabaja en conjunto con un sistema telescópico de la misma manera que lo hace la implementación de la técnica de BFPI.

### 3.1.4. Fotodetectores de posición de cuatro cuadrantes: QPD

Las técnicas para detección de desplazamientos en esquemas de pinzas ópticas basadas en fotodetección son de vital importancia. Este es el caso de la técnica de BFPI y TRMFS, para contextos tanto de atrapamiento óptico fuerte como para medición de fluctuaciones, respectivamente. En ambas técnicas, y de acuerdo a la figura 3.4, el principio de detección es interferométrico, es decir, la luz dispersada y no dispersada es colectada por un lente colimador en donde un patrón de interferencia se formará en su plano focal trasero (BFP). Este patrón entonces cambiará respecto a la posición que tenga el elemento dentro del haz



láser enfocado en el plano de la muestra. Estas variaciones se verán reflejadas en el BFP del lente colimador. Para observar este plano, como ya se ha mencionado, se coloca un sensor de cuatro cuadrantes QPD justo en el plano conjugado del BFP del lente colimador que ha sido formado por una lente convergente. Por lo anterior, es relevante conocer brevemente el funcionamiento y características de un sensor de este tipo ya que tendrá incidencia en la resolución espacio-temporal final de las mediciones. Un esquema de la arquitectura de este tipo de fotosensores es mostrada en la figura 3.5.

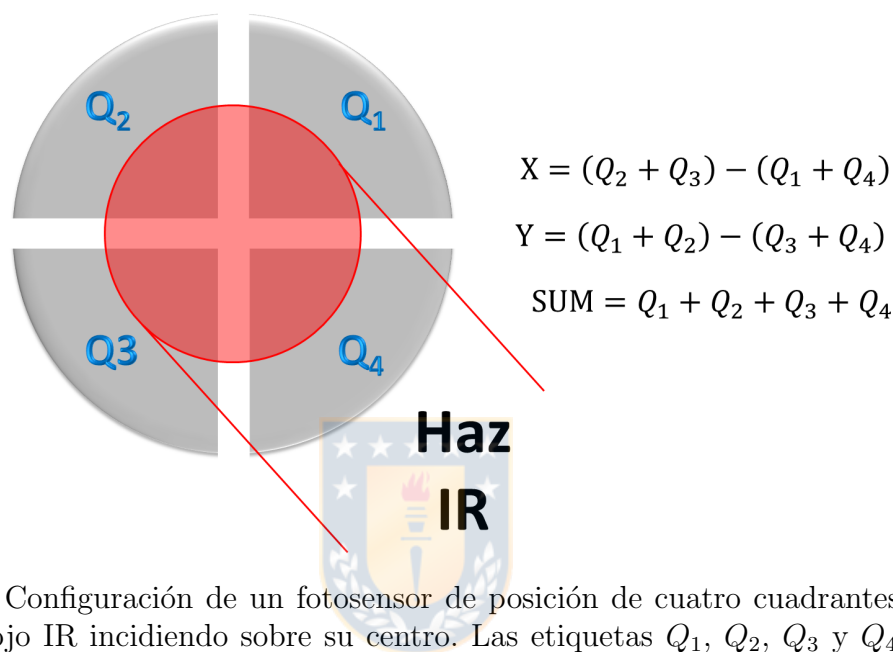


Figura 3.5: Configuración de un fotosensor de posición de cuatro cuadrantes QPD y un haz infrarrojo IR incidiendo sobre su centro. Las etiquetas  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$  y  $Q_4$  indican los cuadrantes definidos dentro del sensor. La desviación del haz desde el centro del sensor produce diferentes fotocorrientes en cada cuadrante las que permiten calcular las coordenadas X, Y y Z del haz sobre el sensor, en donde esta última es la suma de las señales de todos los cuadrantes y es denominada SUM. Mediante una adecuada conversión análogo digital, estas coordenadas son convertidas en señales de voltaje. Las coordenadas X e Y son típicamente también llamadas diferenciales. La señal SUM es utilizada para normalizar los valores de posición X e Y de manera de evitar su sensibilidad a fluctuaciones del láser o de la fuente lumínica incidente. Imagen modificada de Thorlabs Inc. [185].

La figura 3.5 muestra en detalle la arquitectura de un fotosensor de posición de cuatro cuadrantes QPD en el cual un haz infrarrojo IR incide sobre su centro [185]. Como su nombre lo indica, el sensor está segmentado en cuatro sensores que forman los cuadrantes, indicados por  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$  y  $Q_4$ . Los segmentos del sensor son distintos pero iguales en forma y están separados por aproximadamente 0.1 mm entre ellos. Dado que su principio de funcionamiento es por efecto fotoeléctrico, cuando la luz incide sobre los detectores cada uno detectará una fotocorriente de acuerdo a la posición del haz sobre ellos. Lo anterior permite calcular tres coordenadas espaciales, X, Y y una coordenada asociada a Z llamada SUM que es la suma de las señales de los cuatro detectores, tal como se muestra

en la figura 3.5. Típicamente las señales X e Y son también llamadas señales diferenciales. A partir de estas señales y con una adecuada conversión análogo/digital (A/D), estas se pueden convertir en señales de voltaje. De lo anterior, es posible obtener cada coordenada de posición de un haz IR sobre el sensor en unidades de voltaje. Un ejemplo práctico de como entender la lectura de posiciones del QPD es que si un haz Gaussiano está incidendo centrado sobre este, entonces la diferencia de los cuatro cuadrantes será nula y tanto X como Y serán cero. Por el contrario, si el haz se mueve, diferentes corrientes se generarán en cada detector del QPD de manera que X e Y serán diferentes de cero y de una magnitud asociada con el desplazamiento del haz desde el centro del sensor. Además, es importante mencionar que las coordenadas X e Y pueden ser normalizadas dividiéndolas por la señal suma SUM y que es conveniente hacerlo para eliminar la sensibilidad respecto a las fluctuaciones del láser [10]. Esta normalización es realizada sobre las señales de los QPDs involucradas en los experimentos presentados en el actual trabajo.

A continuación, serán descritos diferentes experimentos implementados en escenarios biológicos y de calibración. Para esto se utilizaron las técnicas descritas en 2.5.2 y 2.5.3 asociadas a TRMFS y pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. Por lo anterior, en lo que sigue son presentados los detalles experimentales y los escenarios en los cuales fueron evaluadas estas técnicas de medición y en donde son utilizados los conceptos descritos en 3.1.

### 3.2. TRMFS de pinza única: Estudio de los efectos antioxidantes del resveratrol sobre glóbulos rojos

La espectroscopía de fluctuaciones de membrana (TRMFS) es una técnica principalmente enfocada en detectar la fluctuación dinámica de una membrana lipídica. Mediante la incidencia de un haz infrarojo sobre esta, permite detectar las deflexiones laterales de la luz al interactuar con el objeto. Esta herramienta se fundamenta en las técnicas interferométricas desarrolladas por M. Gögler y T. Betz [50], las cuales, dieron paso a este método de detección y análisis [31, 39, 44]. El análisis de membrana en TRMFS es realizado mediante un modelo matemático de membrana de Helfrich [118–121] como ya ha sido mencionado en 2.5.2. La técnica de espectroscopía utilizada en TRMFS está íntimamente relacionada con el principio físico subyacente a la técnica de interferometría de plano focal trasero (BFPI) [71, 72]. Lo anterior permite que, la luz dispersada y no dispersada por un objeto que se encuentra dentro de un haz enfocado que es colectado por un lente objetivo colimador, produzca un patrón de interferencia en el plano focal trasero de este último lente. Así, la medición de la dinámica de membranas celulares en TRMFS es realizada al colocar un haz enfocado de baja potencia sobre una membrana lipídica, sin producir atrapamiento. Las fluctuaciones dinámicas de la membrana entonces generarán cambios dinámicos en la distribución del patrón de intensidad de interferencia en el BFP del lente colimador. Debido a consideraciones prácticas de accesibilidad, no es posible colocar un fotosensor de posición exactamente en el BFP del lente colimador. Por lo anterior, es

utilizada óptica adicional para formar un plano conjugado del BFP en otra posición. En este plano conjugado entonces es colocado el fotosensor de posiciones que, típicamente, es un fotodetector de cuatro cuadrantes (QPD) como el descrito en 3.1.4. Esta técnica ha sido utilizada para determinar la dependencia de las fluctuaciones de membrana de glóbulos rojos en función de los niveles de ATP [31], como también para mediciones de la mecánica de neuritas [48, 49], entre otros. El esquema experimental y los principios de medición de desplazamientos de TRMFS, están basados en esquemas de pinzas ópticas de atrapamiento fuerte [50], pero reenfocados a la medición de movimientos de las membranas celulares. Comparativamente, se puede decir que la diferencia fundamental entre esquemas de TRMFS y esquemas de pinzas ópticas de atrapamiento fuerte, en donde ambas utilizan los principios de BFPI, es que la primera trabaja en el rango de potencias débiles, es decir, el haz enfocado es utilizado como un haz de prueba que es perturbado por el borde de una membrana pero que en ningún caso debe atrapar. Por el contrario, las pinzas ópticas de atrapamiento fuerte que utilizan los mismos principios de detección de desplazamientos de objetos en el plano de la muestra, trabajan en el régimen de potencias altas, es decir, el haz enfocado atrapa el objeto, y sus desplazamientos dentro de la trampa óptica son los detectados luego en el sensor QPD. La técnica TRMFS es una herramienta que permite obtener resoluciones espaciales y temporales del orden de al menos los nanómetros y los microsegundos, respectivamente. Rangos de resolución espacial incluso bajo los nanómetros son mencionados en la literatura para esta técnica [47]. Por su parte, esquemas experimentales similares de pinzas ópticas, pero en regímenes de atrapamiento fuerte y en otros contextos biológicos, han logrado resoluciones de este mismo orden e incluso superiores [4, 10, 70, 113, 170]. De acuerdo a lo anterior, se implementó un sistema de TRMFS para medir fluctuaciones de glóbulos rojos con precisión al menos nanométrica en un esquema equivalente a una pinza óptica única trabajando en régimen de potencia débil. Este sistema es utilizado para medir los efectos de diferentes concentraciones de resveratrol sobre la fluctuación de la membrana lipídica de glóbulos rojos. Adicionalmente, se debe mencionar que el montaje de esta herramienta está basada en la modificación de un esquema de pinzas ópticas duales implementada por Moffitt et al [10–16].

En la figura 3.6, se presenta el montaje experimental del sistema TRMFS de pinza única implementado para estudiar los efectos de diferentes concentraciones de resveratrol sobre las fluctuaciones de membrana de glóbulos rojos. El sistema cuenta con un conjunto de sistemas y elementos con funcionalidades específicas. En particular, dos espejos, M1 y M2, permiten elevar un haz láser infrarrojo (Ventus HP, 5000 mW,  $\lambda = 1064$  nm, Quantum Laser), que minimiza daños en especímenes biológicos [186], hasta un sistema de control de potencia formado por HWP1-PBS1-HWP2. Tanto HWP1 (AHWP05M-980, Thorlabs Inc.) como HWP2 (AHWP05M-980, Thorlabs Inc.), corresponden a láminas de media onda para la rotación de polarización, y el PBS1 (CCM1-PBS253, Thorlabs Inc.), a un cubo polarizador. Rotaciones de HWP1 junto a las propiedades de transmisión del PBS1, permiten controlar la potencia de la luz de entrada al sistema. Por su parte, HWP2 posibilita rotar libremente su polarización. Este control de potencia es complementado con un filtro de densidad neutra NDF. Todos estos elementos, limitan la potencia en el sistema para evitar efectos de atrapamiento en el plano de la muestra al permitir operar

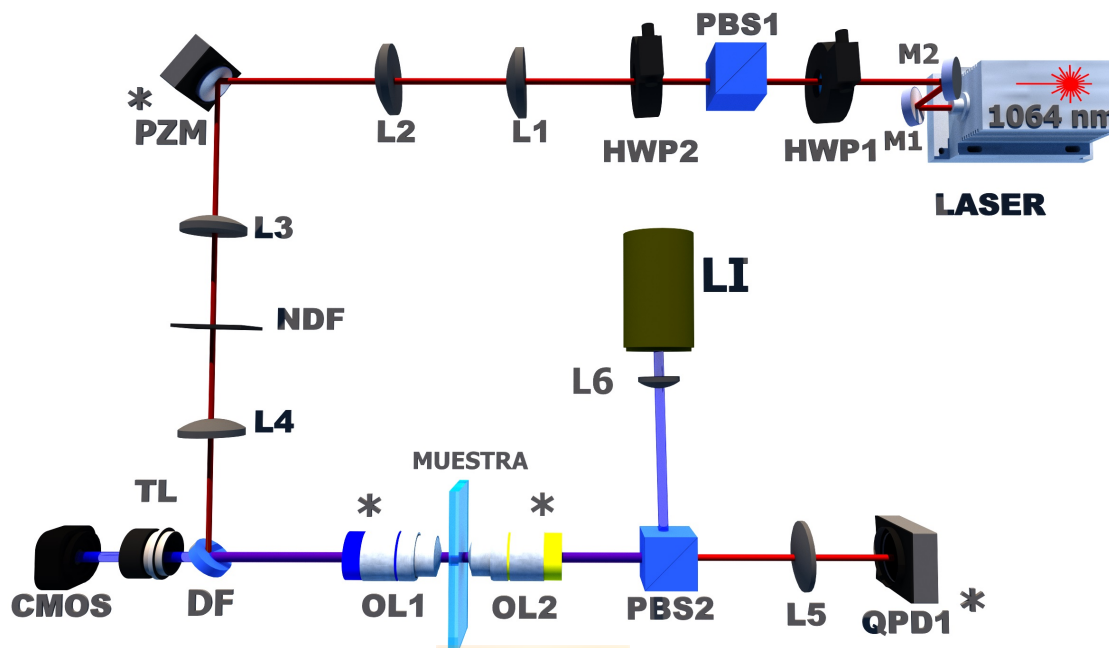


Figura 3.6: Esquema experimental propuesto para la medición de fluctuaciones de membranas lipídicas en glóbulos rojos mediante la técnica TRMFS. Un láser de  $\lambda = 1064 \text{ nm}$  es elevado por un periscopio formado por espejos M1 y M2. El conjunto HWP1-PBS1-HWP2 compuesto por dos láminas de media onda, HWP1 Y HWP2, y un cubo polarizador PBS1 más un filtro auxiliar de densidad neutra NDF, permiten el control de la potencia de entrada al sistema y de incidencia en el plano de la muestra. Un conjunto telescópico expansor formado por L1 y L2 permiten ajustar el diámetro del haz. Un espejo piezoeléctrico PZM es colocado en un plano conjugado del plano focal trasero del lente objetivo OL1 mediante un sistema telescópico reductor formado por los lentes L3 y L4 en donde, un espejo dicróico DF, redirecciona la luz hacia el lente objetivo OL1. Este conjunto permite desplazamientos angulares en el plano focal trasero de OL1 sin cambios en el perfil de distribución de intensidad en el mismo (estático). El movimiento angular permite desplazamientos laterales de  $\sim 2 \mu\text{m}$  del haz enfocado por OL1 en el plano de la muestra. La luz enfocada sobre el borde de la célula en régimen de baja potencia, es capturada por un lente objetivo colimador OL2. La luz parcialmente dispersada por la fluctuación de la membrana y la no dispersada, forman un patrón de interferencia en el plano focal trasero de OL2. Un plano conjugado de este es formado mediante una lente L5, y mediante una fuente de iluminación azul LI más un PBS2 entre OL2 y L5, se retroilumina el plano de la muestra para formar su imagen en la cámara CMOS mediante el uso de un lente de tubo TL. Los planos conjugados del sistema son marcados con (\*). Fuente de imagen: elaboración propia.

con potencias menores a 1 mW y, a la vez, prevenir la saturación en las medidas del detector de posición (PDQ80A, Thorlabs Inc.). Por otro lado, los lentes L1 y L2 forman un sistema telescópico expansor de haz para ajustes en el diámetro del haz láser. El espejo piezoeléctrico PZM (KC1-T-PZ, Thorlabs Inc.), junto a un sistema telescópico reductor compuesto por L3 y L4, permiten conformar el sistema de desplazamiento del haz en el plano de la muestra. Este conjunto de elementos, más la reflexión del haz a la salida de L4 mediante un espejo dicróico DF, permiten conjugar los planos de PZM y el del lente objetivo OL1 (UPlanSApo, 60X/1.2 W.I., Olympus, Tokio, Japan). Las rotaciones en el plano focal trasero de OL1 son producidas por rotaciones de PZM, lo que genera desplazamientos laterales del haz enfocado por OL1 en el plano de la muestra. Por su parte, un sistema de detección es formado por un lente colimador OL2 (E Plan 40X/0.65, Nikon), un lente L5 y un fotosensor de cuatro cuadrantes QPD (PDQ80A, Thorlabs Inc.). Así, la luz colimada que emerge desde OL2, pasa por un PBS2 que transmite la luz horizontalmente polarizada, y así, un lente L5 genera un plano conjugado del plano focal trasero de OL2. Este sistema trabaja de manera complementaria con el sistema de desplazamiento del haz de manera que, el plano de PZM, los planos focales traseros de OL1 y OL2, y el plano del QPD, sean planos conjugados. Como consecuencia, la detección en el QPD sólo medirá cambios en la señal por fluctuaciones de membrana y no por desplazamientos laterales del haz en el plano de la muestra. Otros elementos relevantes son los que componen el sistema de visualización de la muestra. Este está compuesto por una fuente de iluminación azul LI, el cual es enfocado en el plano focal trasero del lente OL2 mediante el uso de un lente L6 y una reflexión en PBS2. Esto permite que la luz azul viaje de manera contrapropagante a la luz infraroja, y que al pasar por las lentes OL1 y OL2, un espejo dicróico DF y por una lente de tubo TL, se genere una imagen digital completamente iluminada del plano de la muestra mediante una cámara CMOS (DMCC1545, monocromática, Thorlabs Inc.). Esta descripción general del sistema de TRMFS de un sólo haz, es una adaptación de un sistema de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte [10–16]. Este fue modificado para este trabajo con el fin de generar sólo una pinza operando a potencias en las que no atrapa. Una primera modificación realizada corresponde al uso del control de potencia del sistema formado por el conjunto HWP1-PBS1-HWP2. Operacionalmente, las potencias de las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte son altas. En cambio, para la implementación de este sistema TRMFS fue necesario utilizar bajas potencias en el plano de la muestra, iguales o menores a 1 mW, lo que asegura trabajar en un régimen en donde no existen efectos de atrapamiento sobre el objeto de estudio. La segunda modificación, está relacionada con el sistema de desplazamiento del haz en el plano de la muestra. Este sistema conformado por PZM y un telescopio formado por L3 y L4, debió ser modificado respecto al original. Inicialmente, la arquitectura de pinzas dobles de atrapamiento fuerte contempla un sistema telescópico en donde L3 y L4 tiene la misma longitud focal. Las distancias de este telescopio y su separación con respecto al plano de PZM y al plano focal trasero de OL1, permiten la formación de un sistema  $4f$ . Como consecuencia, el diámetro del haz incidente sobre el espejo piezoeléctrico PZM no se modifica al pasar por el telescopio. Sin embargo, estas mismas características del sistema desplazador del montaje original no pueden ser consideradas aquí. Lo anterior es debido a las características técnicas del PZM del montaje original, el cual mediante sus rotaciones que son trasladadas al plano

focal trasero de OL1, permite desplazamientos angulares amplios, en el orden de varios micrómetros. Las capacidades del PZM del montaje original son ampliamente superiores al utilizado en este montaje de TRMFS de una pinza débil, por lo que se debe hacer una modificación. Esta modificación es fundamental, entre otras cosas, para la calibración del sistema. Esta requiere desplazamientos laterales en el plano de la muestra de  $\sim 2 \mu\text{m}$  para trabajos en membranas de glóbulos rojos y permite la conversión de las señales de fluctuación de la membrana desde volt a nanómetros. Por lo anterior, fue necesario utilizar un sistema telescópico reductor, en donde la longitud focal de L3 es menor que la de L4. Con esto, es posible alcanzar mayores desplazamientos en el plano de la trampa. Para entregar una descripción más detallada acerca del funcionamiento del sistema y como trabajan cada una de sus componentes, se describen abajo sus principales subsistemas respecto a la figura 3.6.

### Control de potencia

Un conjunto de elementos ópticos fue usado para controlar la potencia de operación dentro del sistema, tanto para el control de la potencia que incide sobre el plano de la muestra como para la que incide sobre el sensor de posición de cuatro cuadrantes QPD. En su conformación se utilizaron dos placas de media onda, HWP1 y HWP2, y un cubo divisor de haz polarizador PBS1 para formar el conjunto óptico HWP1-PBS1-HWP2. Además, de manera complementaria se usó un filtro de densidad neutra NDF (Thorlabs Inc.) de manera auxiliar dispuesto entre los lentes L3 y L4. Cuando el haz láser linealmente polarizado incide sobre el conjunto HWP1-PBS1-HWP2, el giro de la lámina HWP1 permite rotar la dirección de la polarización lineal del haz incidente, y como consecuencia, cambia la proporción de los vectores de polarización vertical y horizontal que lo componen. La incidencia de este haz sobre el PBS1, permiten que una de las componentes sea descartada y la otra incida sobre HWP2. En particular para el montaje de TRMFS de una pinza, el cubo PBS1 permite que la componente vertical del haz sea la que incida sobre la segunda HWP2 y la componente polarizada horizontalmente sea descartada. La segunda lámina HWP2 permite entonces rotar libremente la luz polarizada verticalmente que incide sobre ella. Esto, permite controlar la polarización de la luz que entra al sistema pudiendo dejar una polarización completamente vertical como la que incide sobre ella o variar sus componentes. Por su parte, un filtro de densidad neutra NDF es utilizado como un control auxiliar de potencia.

El filtro NDF más el primer conjunto óptico, permiten operar el sistema con una potencia de salida del láser infrarrojo sobre 1 W. Esta potencia es equivalente a suministrar corrientes por sobre el 40 % del total que puede entregar su caja de control. Esta potencia de operación es recomendada por el fabricante del láser pues asegura la estabilidad espacial del haz emitido. Lo anterior, más el control de potencia propio del sistema TRMFS, permiten incidir con potencias iguales o menores a 1 mW sobre el plano de la muestra, asegurando que no se produzcan efectos de atrapamiento sobre la membrana lipídica del glóbulo rojo. Adicionalmente, el control de potencia también permite conseguir potencias que no saturan las señales medidas por el detector QPD.



## Control de desplazamientos

Un sistema de TRMFS debe ser calibrado, es decir, se debe obtener un factor de conversión que permita transformar señales de fluctuación desde unidades de voltaje a nanómetros. La calibración del sistema se realiza mediante el desplazamiento del haz enfocado en el plano de la muestra, desde fuera hacia adentro del glóbulo rojo. Así, se obtendrá la llamada curva de calibración, la que cuenta con una zona lineal desde la cual se extrae un factor de conversión. Por lo anterior, es fundamental contar con un sistema de desplazamiento del haz en el plano de la muestra. Este sistema se compone de un espejo piezoeléctrico PZM y un sistema telescópico reductor compuesto por los lentes L3 y L4 (longitudes focales  $f_3 = 200$  mm y  $f_4 = 75$  mm, respectivamente). Este reduce el diámetro de los haces que pasan por él. Sobre el espejo PZM incide entonces un haz desde un sistema telescópico expansor formado por L1 y L2 (longitudes focales  $f_1 = 50$  mm y  $f_2 = 200$  mm, respectivamente), el cual permite expandir el diámetro del haz que pasa por él. La luz reflejada en PZM se desvía hacia el telescopio reductor formado por L3 y L4. Este, con la ayuda de una reflexión en el espejo dicróico DF, permite entonces conjugar el plano de PZM con el plano focal trasero de OL1. Como consecuencia, movimientos angulares en PZM permiten el desplazamiento lateral del haz enfocado por OL1 sobre el plano de la muestra. Para conseguir la conjugación de planos de manera precisa, PZM y L3 se deben encontrar separados por la distancia focal de L3, el plano focal trasero de OL1 se debe encontrar separado de L4 por una distancia igual a la focal de L4 y las lentes L3 con L4 deben estar separadas por la suma de sus distancias focales. Como consecuencia, la distribución de intensidad en el plano focal trasero de OL1 no varía independiente de los movimientos angulares sobre este.

La elección de un sistema telescópico reductor para el sistema de desplazamientos se debe a que, el rango angular máximo del espejo PZM disponible para este montaje, es de  $\pm 73$   $\mu$ rad cuando se le aplica un voltaje máximo de 150 V mediante su dispositivo de control (MDT693B, Thorlabs, Inc.). Lo anterior, en un sistema telescópico en donde L3 y L4 son de igual longitud focal, como en el trabajo original en el cual se basa este montaje [10], genera que los cambios angulares de PZM correspondan a 600  $\mu$ m de desplazamiento lateral máximo del haz enfocado en el plano de la muestra. Este desplazamiento no es suficiente para calibrar el sistema. En consecuencia, las focales de L3 y L4 se escogieron de tal manera de formar un sistema telescópico reductor, en donde la focal de L4 fuese menor a la de L3. Esto permite conseguir desplazamientos laterales de  $\sim 2$   $\mu$ m, lo que es óptimo para la calibración. Por su parte, el proceso de calibración fue realizado mediante movimientos laterales controlados en el plano de la muestra. Esto permite ir desde afuera hacia adentro del glóbulo de manera controlada y obtener una curva con una zona lineal desde la cual se obtiene el factor de conversión. Para conseguir lo anterior, la caja de control propia del espejo PZM, junto a una interfaz desarrollada en Labview, fueron usadas para aplicar voltajes controlados de pasos de 2 V en un rango de 0 – 150 V para este espejo.

## Sistema de detección

La idea detrás del sistema de detección usado en el montaje de TRMFS de pinza única de la figura 3.6, está basada en los principios interferométricos de detección utilizados en trabajos fundamentales que dan cuenta de esta técnica [31, 39, 44, 50]. Estos utilizan los mismos principios del BFPI usados en [70, 71] para pinzas ópticas. En el contexto de TRMFS, el principio subyacente de detección es la medición de los cambios de la distribución de intensidad de un patrón de interferencia que se forma en el plano focal trasero de un lente objetivo colimador. Este patrón se produce debido a que esta lente captura la luz dispersada y no dispersada por la fluctuación de la membrana lipídica de un glóbulo rojo. El sistema de detección, de acuerdo a lo mostrado en la figura 3.6, funciona a partir de un lente objetivo OL2, un lente L5 y un fotodetector QPD que funciona de manera solidaria con el lente OL1 y el sistema de desplazamiento del haz. Por lo anterior, los lentes objetivos OL1 y OL2 son enfrentados, de manera que la luz enfocada por el lente objetivo OL1 en la membrana del glóbulo rojo, sea capturada por el lente colimador OL2. Desde el plano focal trasero de OL2 emerge un haz colimado que atraviesa un cubo polarizador PBS2, permitiendo que la luz horizontalmente polarizada pase directamente hacia el lente L5 de focal  $f = 150$  mm. Este lente permite formar un plano conjugado del plano focal trasero de OL2, en donde es dispuesto un fotodetector de posición QPD. Las características de funcionamiento más relevantes de este sistema de detección se originan al actuar en conjunto con el sistema de desplazamiento. Como anteriormente se mencionó, el plano de PZM se encuentra conjugado con el plano focal trasero de OL1. Esto, sumado a que el plano focal trasero de OL2 está conjugado con el del QPD, permite que el plano de PZM, el plano focal trasero de OL1 y OL2, y el del QPD, se encuentren todos conjugados. Dado entonces que todos los planos anteriores se encuentran conjugados, la detección en el QPD sólo será sensible a las perturbaciones de la luz producida por la muestra biológica, es decir, por las fluctuaciones de la membrana. Una manera de ejemplificar esto, es pensar en lo que sucede si no hay muestra que perturbe el haz en el plano de la muestra. Si esto sucede, la distribución de intensidad en el plano focal trasero de OL2 no cambiará independiente de los movimientos angulares en la entrada de OL1 (patrón estacionario) y de los movimientos laterales que esto produce en el plano de la muestra. Para lograr esto, es necesario asegurarse que el QPD se encuentra en el plano conjugado de OL2, es decir, insensible a los desplazamientos laterales de la trampa en el plano de la muestra. Para esto, se puede hacer oscilar PZM con una señal periódica y posicionar el QPD en un lugar en que estas oscilaciones sean mínimamente observables. Las distancias consideradas aquí, están guiadas por lo indicado por Moffitt et al. [10–14, 16], el cual dispone un lente L5 a una distancia de dos veces su longitud focal respecto del focal del plano focal trasero de OL2 y esta misma separación es usada entre L5 y el plano del QPD. En la práctica, esto no es exacto por lo que es necesario mover el QPD en el entorno de su posición, para de esta manera, alcanzar la condición requerida. Finalmente, desde un punto de vista técnico, es relevante tener presente que el detector QPD permite detección nominal de señales entorno a los 100 kHz, en donde dada la frecuencia de Nyquist, se puede acceder en la práctica a fenómenos biológicos de frecuencias de hasta 50 kHz. Además, la señal adquirida por este fotosensor es digitalizada mediante una tarjeta DAQ (National Instruments, NI, USA).



## Sistema de visualización

Para la visualización de la muestra, se utiliza una fuente de iluminación de luz azul LI la cual es enfocada sobre el lente colimador OL2 por medio de la lente L6 y la reflexión producida en el cubo polarizador PBS2. Esto permite generar iluminación Köhler sobre el plano de la muestra [12]. La luz azul, viaja entonces de manera contrapropagante a la luz infraroja, permitiendo que al pasar por las lentes OL1 y OL2, un espejo dicróico DF y por una lente de tubo TL, se genere una imagen digital completamente iluminada del plano de la muestra mediante el uso de una cámara CMOS. De esta manera, es posible apreciar correctamente la imagen de los glóbulos rojos estudiados como también el haz infrarojo que llega por reflexión a la cámara. Es relevante considerar que el haz infrarojo de la trampa débil se forma en la imagen debido a que una pequeña porción de la luz enfocada por el lente OL1 se refleja de manera contrapropagante. Esta, al salir por el plano focal trasero de OL1, se transmite por el espejo dicróico DF, llegando al lente de tubo TL y formándose su imagen en la cámara CMOS. Su imagen entonces puede ser eliminada de la imagen de la muestra si un filtro infrarojo es puesto delante a la cámara. Así, se puede tener una imagen del plano de la muestra que muestre sólo el espécimen biológico de estudio.

### 3.3. TRMFS de pinza doble: Estudio de los efectos de la glucosa sobre glóbulos rojos

La espectroscopía de fluctuaciones de membrana (TRMFS) ha sido tradicionalmente implementada para estudiar el movimiento de membranas lipídicas de células mediante la utilización de un sólo haz de inspección [31, 39, 44, 48, 49]. Esquemas de este tipo, son equivalentes al indicado en este trabajo en la sección 3.2 para el estudio de los efectos del resveratrol sobre la fluctuación de la membrana lipídica de glóbulos rojos. Este esquema, permite la obtención de la fluctuación y de parámetros mecánicos de la membrana tales como el módulo de flexión y la tensión. Una limitación de este esquema es que se trata de una medición local, lo cual significa que permite caracterizar el comportamiento mecánico de la membrana a partir de la medición de un sólo punto. Sin embargo, es posible realizar un montaje modificado de esta técnica en donde dos haces de luz permitan inspeccionar dos puntos simétricamente separados de una célula de manera de obtener información desde dos puntos de la membrana lipídica. Lo anterior, permite comparar los efectos sobre esta cuando se aplican cambios en las concentraciones que componen el medio. En particular, un esquema con la capacidad de obtener información de señales de fluctuación de dos puntos simétricamente separados de una membrana, permite realizar análisis de correlaciones entre ellas. Basados en esto, se consideró para este trabajo, la implementación de la técnica de TRFMS de dos haces para el estudio de los efectos de distintas concentraciones de glucosa sobre el comportamiento de la membrana lipídica de glóbulos rojos. Un esquema de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte [10–16] fue utilizado como base para la implementación de la técnica de TRMFS de doble haz. La principal diferencia entre las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte y el esquema de TRMFS

de doble haz propuesto será entonces que esta última es operada a bajas potencias. Esto permite medir fluctuaciones de membrana en dos puntos evitando efectos de atrapamiento. Una de las características principales de los dos haces generados, además de su uso a bajas potencias, es que estos se encuentran ortogonalmente polarizados de manera de evitar efectos de interferencia en el plano de la muestra. Por último, la implementación considera en todo momento maximizar la aislación del sistema de las vibraciones mecánicas del entorno que potencialmente puedan influir en la detección de las fluctuaciones de membrana.

Una descripción detallada del montaje e implementación de la técnica de TRMFS de doble haz propuesto para este trabajo, es descrito en la figura 3.7. El esquema presenta similares características que el esquema de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte presentado por Moffitt et al. [10–16] y otros autores [113]. Si bien muchos de los elementos principales utilizados en la técnica TRMFS para una pinza se mantienen en este esquema, existen diferencias fundamentales asociadas entre otras cosas a generar dos haces ortogonales para la medición. Las principales características y funcionamiento de este sistema de doble haz para TRMFS pueden ser indicadas de manera general. De acuerdo a la figura 3.7, un láser infrarrojo (Ventus HP, 5000 mW,  $\lambda = 1064$  nm, Quantum Laser), usado para minimizar daños en especímenes infrarrojos [186], incide sobre un sistema de control de potencia. Este se conforma esencialmente por el conjunto óptico HWP1-PBS1-HWP2, en donde HWP1 y HWP2 corresponden a láminas de media onda (AHWP05M-980, Thorlabs Inc.) y el PBS1 a un cubo polarizador (CCM1-PBS253, Thorlabs Inc.). La lámina HWP1 permite rotar la polarización lineal del láser incidiendo sobre esta, logrando que la luz incidente que llega a PBS1 contenga una porción de polarización vertical y otra horizontal, según como se haya rotado la lámina. En este montaje en particular, un PBS1 permite el paso de la componente de polarización horizontal de la luz, descartando hacia un costado la componente vertical. Esto permite controlar la potencia que entra directamente al sistema. La luz polarizada horizontalmente emergiendo del PBS1 entonces incide sobre la lámina HWP2. El giro de esta lámina permite rotar la polarización de la luz que incide sobre ella, permitiendo que a su salida, emerja un nuevo haz linealmente polarizado formado por dos componentes, vertical y horizontal, en donde la proporción entre estas puede ser controlada mediante el giro de la misma lámina. Esto es utilizado para controlar la potencia de los haces enfocados que luego llegan al plano de la muestra, es decir, de las trampas débiles. Además, un filtro NDF es usado de manera auxiliar si es necesario disminuir aún más las intensidades dentro del sistema. Luego, la luz emergiendo de HWP2, incide sobre un conjunto formado por dos lentes, L1 y L2 (focales  $f_1 = 50$  mm y  $f_2 = 200$  mm, respectivamente), las cuales forman un sistema telescópico expansor que ajusta el diámetro del haz a su entrada, haciéndolo mas grande. La luz que emerge desde este telescopio incide entonces sobre un cubo polarizador PBS2 (CCM1-PBS253, Thorlabs Inc.). Este cubo separa las componentes de la luz linealmente polarizada que incide sobre él. Esto implica que la componente horizontalmente polarizada se separa de la vertical. Luego, la luz de polarización horizontal incide sobre el espejo piezoeléctrico PZM1 (KC1-T-PZ, Thorlabs Inc.) y la vertical sobre PZM2 (KC1-T-PZ, Thorlabs Inc.). Ambos haces, emergen ahora recombinados desde un PBS3 hacia un segundo telescopio reductor conformado por las lentes L3 y L4 (focales  $f_3 = 200$  mm y  $f_4 = 75$  mm, respectivamente), el cual

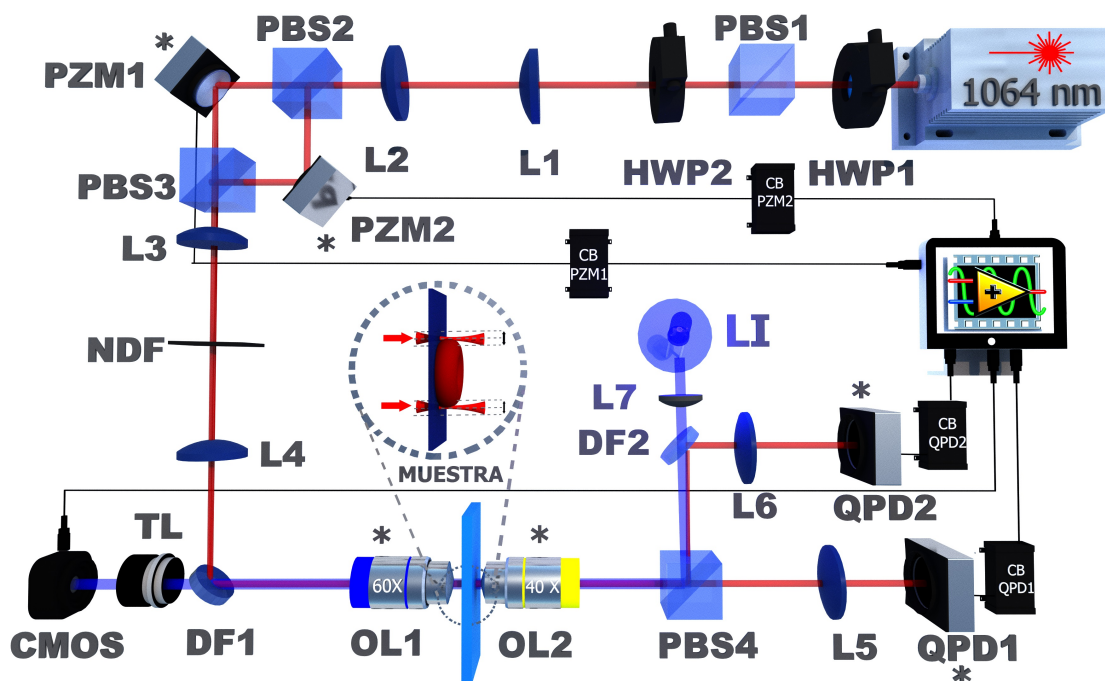


Figura 3.7: Esquema experimental implementado para la medición de fluctuaciones en dos puntos de una membrana lipídica en glóbulos rojos mediante la técnica TRMFS de doble haz. Un láser de  $\lambda = 1064$  nm incide sobre un sistema de control de potencia compuesto por el conjunto HWP1-PBS1-HWP2 más un filtro de densidad neutra NDF auxiliar, y en donde HWP1 y HWP2 son láminas de media onda y PBS1 es un cubo polarizador. Un telescopio expander formado por L1 y L2 permiten ajustar el diámetro del haz. Un cubo polarizador PBS2 genera dos haces ortogonalmente polarizados. Los espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2 reflejan los haces, emergiendo recombinados por cubo polarizador PBS3 hacia un telescopio de magnificación unitaria compuesto por L3 y L4. Los haces saliendo de este telescopio son reflejados por el espejo dicróico DF1 hacia el plano focal trasero de OL1. Rotaciones de PZM1 y PZM2 generan entonces desplazamientos angulares en el plano focal trasero de OL1 y desplazamientos laterales de los haces ortogonales de baja potencia formados por este lente en el plano de la muestra. La luz de los haces enfocados en el plano de la muestra son parcialmente dispersados por la membrana y se forma un patrón de interferencia para cada haz en el plano focal trasero de OL2. Un plano conjugado de este es formado para detectar las variaciones en los patrones de interferencia de cada haz. La luz transmitida por PBS4 y la lente L5 forman el plano conjugado para el haz de polarización horizontal y la reflexión en PBS4, en el espejo dicróico DF2, más el uso de la lente L6, forman el plano conjugado para el haz de polarización vertical. Fotodetectores de posición QPD1 y QPD2 son posicionados en esos planos y serán sensibles sólo a perturbaciones en los haces debido a las fluctuaciones de membrana. Además, la muestra es visualizada mediante el uso de una fuente de iluminación azul LI enfocada mediante una lente L7 y el uso de una lente de tubo TL y una cámara CMOS. Esto permite generar una imagen completamente iluminada de la muestra. Fuente de imagen: elaboración propia.

reduce el diámetro de los haces respecto al de su entrada. Similar a lo indicado en sección 3.2, este telescopio reductor permite formar dos subsistemas desplazadores de haz. Estos, hacen posible el movimiento lateral de los haces enfocados en el plano de la muestra, uno polarizado horizontalmente y el otro vertical. El primer subsistema desplazador es para el haz polarizado horizontalmente y está formado por PZM1 en conjunto con el telescopio reductor. Por su parte, el segundo subsistema desplazador es para el haz polarizado verticalmente y está formado por PZM2 en conjunto con el telescopio reductor. A través del telescopio reductor, y con la ayuda de un espejo dicróico DF1, se pueden conjugar el plano de rotación de cada espejo piezoeléctrico con el plano focal trasero del lente OL1. Para que esto suceda, L3 debe encontrarse separado por su longitud focal respecto de PZM1 y PZM2, y L4 debe estar separado por su longitud focal con respecto a OL1. Adicionalmente, la separación entre L3 y L4 es la suma de sus distancias focales. Rotaciones de PZM1 y PZM2 permitirán entonces el desplazamiento lateral de los haces polarizados ortogonalmente en el plano de la muestra, en donde cada haz es enfocado por OL1 en ese plano. Esto, es consecuencia de que las rotaciones en cada espejo piezoeléctrico se reflejan en el plano focal trasero de OL1 (UPlanSApo, 60X/1.2 W.I., Olympus, Tokio, Japan) sin cambio de las distribuciones de intensidad de los haces en ese plano. Luego, un sistema formado por un lente colimador OL2 (E Plan 40X/0.65, Nikon), las lentes L5 y L6, y los fotosensores de cuatro cuadrantes QPD1 (PDQ80A, Thorlabs Inc.) y QPD2 (PDQ80A, Thorlabs Inc.), son dispuestos para formar el sistema de detección. Este sistema de detección trabaja en forma solidaria con el lente objetivo OL1 y el sistema de control de desplazamiento. Así, un lente colimador OL2 (E Plan 40X/0.65, Nikon) es puesto enfrente de OL1 de manera de colectar la luz proveniente del plano de la muestra en donde están enfocados los haces. La luz de ambos haces, vertical y horizontal, son colimados por OL2 y dirigidos hacia un cubo polarizador PBS4. Este cubo separa las componentes de polarización horizontal y vertical del haz colimado. La componente horizontal es transmitida por PBS4, incidiendo luego en el lente L5, el cual forma un plano conjugado de la distribución de intensidad en el plano focal trasero de OL2 asociado a esta componente. En ese lugar es dispuesto entonces el QPD1. Similar a lo anterior, la componente vertical es reflejada por PBS4 y luego por un espejo dicróico DF2, incidiendo luego en el lente L6. Este lente forma un plano conjugado de la distribución de intensidad en el plano focal trasero de OL2 asociado ahora a esta componente vertical. En ese lugar entonces es dispuesto el QPD2. En principio, para posicionar correctamente los fotodetectores QPD1 y QPD2 sobre estos planos conjugados, se debe verificar que al aplicar una señal periódica a los espejos PZM1 y PZM2, estos fotodetectores estén en una posición donde esta señal no se perciba. De esta manera, se logrará que los planos de PZM1 y PZM2 estén conjugados con los planos focales traseros de OL1 y OL2, y a la vez, que los planos PZM1 y PZM2 estén conjugados con los planos de los fotodetectores QPD1 y QPD2, respectivamente, igual a lo que sucede para el caso de TRMFS como se indica en la sección 3.2. Estos planos conjugados son señalados con (\*) en la figura 3.7. Adicionalmente, un sistema de iluminación compuesto por una fuente de iluminación azul LI, un lente L7, un lente de tubo TL y una cámara CMOS son utilizados para formar una imagen del plano de la muestra. Estos elementos trabajan de forma solidaria con PBS4, DF2, las lentes OL1 y OL2, y con DF1. Así, la iluminación LI es enfocada en el plano focal trasero de OL2 por L7 luego de su transmisión

por DF2 y reflexión en PBS4. De esta manera, la luz viaja en forma contrapropagante a la luz infraroja, lo que permite que luego de pasar por los lentes objetivo OL1 y OL2, el espejo dicróico DF1 y la lente de tubo TL, se forme una imagen del plano de la muestra sobre la cámara CMOS (DMCC1545, monocromática, Thorlabs Inc.). Un detalle relevante es que, enfocar la iluminación en el plano focal trasero de OL2, permite realizar iluminación Köhler en el plano de la muestra y así, se puede obtener una imagen completamente iluminada. Para una mejor comprensión del sistema, los subsistemas más relevantes del esquema de TRMFS de dos haces es descrito un poco más en detalle.

## Láser

Para el montaje se utilizó un láser IR (Ventus HP, 5000 mW,  $\lambda = 1064$  nm, Quantum Laser). Longitudes de onda infrarojas de este tipo son típicamente utilizadas dado que han mostrado que, en una buena aproximación, no dañan el objeto biológico de estudio [186]. Por otro lado, cualquiera sea el láser utilizado, es de particular relevancia para la técnica su estabilidad espacio-temporal, es decir, que su deriva espacial en el tiempo sea la menor posible y que su estabilidad temporal en potencia sea la mayor posible. En este sentido, se debe operar a potencias de salida del láser que permitan su estabilidad a la vez que, en el plano de la muestra, las potencias sean bajas para no ejercer atrapamiento sobre la membrana lipídica del glóbulo rojo. Esto se logra al conseguir dos condiciones al mismo tiempo. La primera, al operar a una potencia de salida del láser infrarrojo sobre 1W, equivalente a suministrar corrientes por sobre el 40% del total que puede entregar su caja de control, y la segunda, al lograr que al plano de la muestra lleguen, por cada trampa, potencias no superiores a 1 mW. Esto se obtiene mediante el control de potencia y los diferentes filtros en el sistema. En este sentido, también es relevante considerar que la gran cantidad de componentes ópticas producen pérdidas importantes. Por lo anterior, es recomendable utilizar potencias de salida del láser mucho más allá del límite mencionado de 1 W. Adicionalmente, es relevante mencionar que el láser fue conectado a un equipo de enfriamiento por agua (Chiller UC160-190, Solid State Cooling System). Lo anterior, permitió mantener su temperatura estable y dentro de un rango adecuado de operación durante la emisión.

## Control de potencia

El primer conjunto óptico con que se encuentra el haz linealmente polarizado del láser es el control de potencia, conformado por el conjunto HWP1-PBS1-HWP2. Sobre la HWP1 incide la luz del láser, y mediante la rotación de esta lámina, es posible controlar la proporción de sus componentes de polarización vertical y horizontal. La luz emergiendo desde aquí, pasa entonces por un PBS1 que descarta una de las componentes. En particular, se suprime la componente vertical y la horizontal, incide sobre HWP2. Esta segunda lámina permite rotar de manera libre la componente horizontal que incide sobre ella de tal forma de generar un haz formado por dos componentes ortogonalmente polarizadas en su salida. Lo anterior, hace posible controlar la proporción entre estas componentes, las que luego son utilizadas para formar las trampas débiles sobre el plano de la muestra mediante el



lente objetivo OL1 y que permiten medir las fluctuaciones de membrana. Adicionalmente, HWP2 permite equilibrar las potencias de las trampas débiles, aspecto fundamental de la medición para que ambas mediciones de fluctuación sean comparables. Por último, un filtro NDF es usado de manera auxiliar si es necesario disminuir aún más la intensidad de la luz que llega al plano focal trasero del lente objetivo OL1 y que permite formar las trampas débiles.

### **Sistema de generación y control de desplazamiento de trampas débiles ortogonales**

Al salir la luz de HWP2, esta se encuentra en el camino óptico con un sistema telescópico expansor compuesto por las lentes L1 y L2 (focales  $f_1 = 50$  mm y  $f_2 = 200$  mm, respectivamente) que permiten aumentar el diámetro del haz. Este, luego del telescopio expansor, emerge con dos componentes de polarización, vertical y horizontal, las que inciden sobre el sistema de generación y control de trampas débiles ortogonales. Este sistema está compuesto por dos cubos polarizadores, PBS2 y PBS3, dos espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2, un telescopio reductor y un espejo dicróico DF1. La luz proveniente del telescopio expansor ingresa por PBS2, el cual separa las componentes de polarización que trae la luz. Esto genera dos haces independientes polarizados ortogonalmente, uno horizontal y el otro vertical. El haz polarizado horizontalmente incide sobre PZM1 y el vertical sobre PZM2. Ambos haces son recombinados mediante un PBS3, emergiendo ambos hacia un telescopio reductor formado por L3 y L4 (focales  $f_3 = 200$  mm y  $f_4 = 75$  mm, respectivamente). Este telescopio reductor disminuye el diámetro del haz de entrada pues la focal de L4 es menor a la de L3. Los haces luego de este telescopio son reflejados por un espejo dicróico DF1 hacia el plano focal trasero del lente OL1. En este punto, podemos identificar dos subsistemas de desplazamiento de haces en el plano de la muestra. El primero está conformado por PZM1, el telescopio reductor y un elemento auxiliar como DF1, lo que permite conjugar el plano de PZM1 con el plano focal trasero del lente OL1. Rotaciones de PZM1 entonces generan un desplazamiento lateral del haz polarizado horizontalmente en el plano de la muestra. El segundo subsistema de desplazamiento, es idéntico pero está compuesto por PZM2, el telescopio reductor y DF1. Este permite desplazar en el plano de la muestra el haz polarizado verticalmente mediante la rotación de PZM2.

Es fundamental tener presente que, si bien las rotaciones de PZM1 y PZM2 producen rotaciones en el plano focal trasero de OL1, y a la vez desplazamientos laterales de los haces enfocados en el plano de la muestra, el perfil de intensidad de cada haz no variará en el plano focal trasero de OL1 pues es un punto pivote. Otros detalles técnicos relevantes son importantes de mencionar. Para conjugar los planos PZM1 y el plano de PZM2 con el plano focal trasero de OL1, es necesario que el lente L3 esté separado por su longitud focal respecto de PZM1 y PZM2, y por su parte, L4 esté separado por su longitud focal respecto del plano focal trasero de OL1. Por otro lado, el telescopio reductor utilizado tiene por finalidad aumentar el desplazamiento posible permitido por los espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2. Ambos, son controlados de manera coordinada por una caja de control

común (MDT693B, Thorlabs Inc.) que permite aplicar, a cada uno, voltajes en el rango de 0 – 150 V. Sin embargo, aplicar a cada uno de ellos el rango completo de voltaje, sólo permite rotaciones de  $\pm 73 \mu\text{rad}$  en cada espejo. Si utilizamos un telescopio con lentes L3 y L4 de igual focal para conjugar los planos de PZM1 y PZM2 con el plano focal trasero de OL1, entonces las rotaciones de PZM1 y PZM2 producirían desplazamientos laterales menores que con un telescopio reductor como es propuesto. Con este telescopio reductor, es posible lograr desplazamientos laterales de  $\sim 2 \mu\text{m}$  en el plano de la muestra para cada trampa débil. Esto es suficiente para realizar el proceso de calibración del sistema de manera de obtener el factor de conversión de volt a nanómetros como también para medir las fluctuaciones. En particular, el proceso de calibración del sistema es realizado mediante el movimiento sincrónico de cada trampa desde afuera hacia adentro del glóbulo, es decir, una entrando desde la izquierda y la otra desde la derecha. Dos curvas son obtenidas, una para cada trampa, en donde ambas contienen una zona lineal que muestra el nivel de voltaje de la señal variando linealmente con la posición de las trampas dentro del glóbulo. Usando la pendiente de esta zona lineal entonces es obtenido un factor de conversión que permite convertir las señales de voltaje a nanómetros. Para realizar este procedimiento, tal como muestra la figura 3.7, es usada la caja de control propia de los espejos PZM1 y PZM2 junto a una interfaz desarrollada en Labview para realizar los movimientos rotacionales sincrónicos de los espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2. Estos permiten desplazamientos laterales coordinados de las trampas débiles en el plano de la muestra, avanzando una desde la izquierda y la otra desde la derecha hacia el interior de glóbulo. Para las rotaciones de los espejos piezoeléctricos en su rango completo, fueron aplicados voltajes en un rango de 0 – 150 V en pasos de 2 V para cada espejo.

### Sistema de soporte de muestra biológica

En el caso del diseño y mediciones en la implementación de la técnica TRMFS, o cualquier esquema basado en arquitecturas de pinza ópticas, es fundamental el soporte mecánico que sostiene la muestra de estudio. En particular para este esquema de TRMFS de doble haz, las mediciones implican que los glóbulos rojos estén adheridos al portamuestra. Por lo anterior, cualquier vibración o desplazamiento mecánico afectará la medida. En la práctica, para encontrar glóbulos dentro de la muestra, es necesario desplazarse de manera controlada dentro de la cámara que los contiene a la vez que se deben mantenerse enfocados al momento de la medición. Lograr lo anterior implica un sistema de soporte de muestra robusto y mecánicamente estable. Con este fin, se utilizaron bases de traslación micrométricas estándar (PT1, Thorlabs Inc.) que, unidas en un sistema de 3 ejes, permiten el desplazamiento dentro de la muestra en un rango de 1" para cada uno de ellos. Los ejes X e Y, entonces permiten el desplazamiento en el plano de la muestra y el desplazamiento en el eje Z, permite el enfoque del glóbulo rojo en estudio y el posicionamiento de los haces enfocados sobre él. Por su parte, la cámara que contiene los glóbulos rojos, formada por dos vidrios portamuestra (24x50 y 18x18 mm, Hirschmann), fue acoplada a este sistema de traslación mediante una pieza mecánica de dos pinzas metálicas con resorte para sostenerla firmemente.



## Sistema de detección

Los conceptos y elementos ópticos para la detección del esquema de TRMFS de doble haz son los mismos a los usados para TRMFS de pinza única de la sección 3.2. Sin embargo, debido al uso de dos haces ortogonalmente polarizados, algunos elementos ópticos deben ser incorporados. Para explicar el sistema de detección completo se puede considerar que este se encuentra compuesto por un lente objetivo OL2, un cubo polarizador PBS4, un espejo dicróico DF2, los lentes L5 y L6 y los fotodetectores de posición QPD1 y QPD2. Estos elementos forman un sistema que trabaja de forma solidaria con el lente objetivo OL1 y los sistemas de desplazamiento de los haces. Primero, el principio de funcionamiento se basa en que los planos de PZM1 y PZM2 se encuentran en un plano conjugado del plano focal trasero de OL1. A partir de esto, un lente OL2 colimador es puesto enfrente de OL1 de tal forma que colecte la luz proveniente del plano de la muestra. Esto permite que el plano focal trasero de OL1 y OL2 ahora se encuentren conjugados. La consecuencia de que estos planos se encuentren conjugados es que el patrón de intensidad en el plano focal trasero de OL2 será insensible a desplazamientos de las trampas en el plano de la muestra y sólo sufrirá cambios si los haces en el plano de la muestra son perturbados por algún objeto de fase. En nuestro caso, este objeto es la membrana del glóbulo rojo. Esta perturbación entonces provocará un patrón de interferencia dinámico, para cada haz, los que variarán en función de la fluctuación de la membrana en su punto de medición. Debido a la accesibilidad del plano focal trasero OL2, se forman dos planos conjugados de este, en donde en uno se forme la información del patrón de interferencia asociado al haz de polarización horizontal y en el otro plano el asociado al haz de polarización vertical. Estos planos son formados con la ayuda de un PBS4, un espejo dicróico DF2 y los lentes L5 y L6 (focales  $f_5 = 150$  mm y  $f_6 = 150$  mm, respectivamente). Así, el PBS4 separa el haz con polarización horizontal y vertical. El haz con polarización horizontal pasa entonces por el lente L5 y permite formar el patrón de intensidad del plano focal trasero de OL2 asociado a esta polarización. En este lugar se posiciona el fotodetector QPD1. A su vez, el haz con polarización vertical es reflejado por el PBS4 y luego reflejado por un espejo dicróico DF2, en donde un lente L6 forma la distribución de intensidad del plano focal trasero de OL2 asociado a esta última polarización. En este lugar se posiciona el fotodetector QPD2. Para los planos conjugados mencionados, tanto L5 como L6 están separados del plano focal trasero de OL2 a una distancia del doble de sus longitudes focales. Por su parte, los fotodetectores QPD1 y QPD2 también están separados de L5 y L6 por el doble de sus longitudes focales respectivamente. Por simplicidad, ambas lentes tienen la misma focal, por lo que las distancias se replican para ambos casos. De manera teórica, la distancia a la que son colocados los fotodetectores QPD1 y QPD2 permite colocarlos exactamente en el plano conjugado del plano focal trasero de OL2. Sin embargo, en la práctica es conveniente rotar los espejos PZM1 Y PZM2 mediante una señal periódica y corroborar que en la posición de QPD1 y QPD2 no se aprecie esta señal o al menos sea minimizada. Cuando esto sucede, los fotodetectores están perfectamente posicionados

## Sistema de visualización

Un sistema de visualización de la cámara portamuestra es fundamental para realizar los procesos de calibración y medición. Entre otras cosas, este permite verificar la posición de los haces en el plano de la muestra y la evaluación de las características morfológicas de los glóbulos rojos. El sistema de visualización está compuesto por una fuente de iluminación azul LI, un lente L7, un lente de tubo TL (Longitud focal de diseño: 200 mm, Nikon) y una cámara CMOS (DMCC1545, monocromática, Thorlabs Inc.). Este sistema trabaja de manera solidaria con el cubo PBS4, los lentes OL1 y OL2, y el espejo dicróico DF1. La iluminación azul LI es entonces enfocada por un lente L7 sobre el plano focal trasero del lente OL2 [12] de manera de generar iluminación Köhler sobre la muestra. La iluminación que viaja de forma contrapropagante respecto del láser infrarojo, emerge por OL1, transmitiéndose por DF1 e incidiendo luego sobre el lente de tubo TL el cual, permite que en la cámara CMOS se forme una imagen completamente iluminada del plano de la muestra. Filtros infrarojos entre TL y la cámara CMOS pueden ser utilizados para eliminar de la imagen los haces correspondientes de la trampa. Las trampas se forman en la imagen debido reflexiones residuales de los haces sobre la lámina de vidrio del portamuestra. Estas reflexiones viajan entonces de manera contrapropagante, y al emerger desde plano focal trasero del lente objetivo OL1, inciden sobre TL. Este lente permite, junto a la cámara CMOS, la formación de la imagen de los haces del plano de la muestra.

### 3.4. Pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte

La implementación experimental y el desarrollo de capacidades de adquisición y procesamiento de datos adquiridos con las técnicas presentadas en las secciones 3.2 y 3.3, tuvieron por objetivo adquirir las competencias necesarias para lograr la implementación de un sistema de pinzas ópticas dobles para detección diferencial. La motivación principal para el diseño y medición a través de este tipo de herramientas se basa en las limitaciones asociadas al ruido presente típicamente en los diseños de pinzas ópticas únicas al estudiar especímenes biológicos tales como el ADN o proteínas únicas, entre otros. En experimentos de pinza óptica única, un extremo del espécimen biológico en estudio es adherido a una superficie y, el otro extremo que queda libre, es atrapado con la pinza óptica. La superficie utilizada para adherir el espécimen estudiado es la superficie del portamuestra que lo contiene. Variaciones de este método de pinza única atrapan uno de los extremos mediante la succión por pipeta y el otro con la trampa óptica. El principal problema de este tipo de mediciones es que se ven expuestas al ruido mecánico [5] debido a que el objeto de estudio permanece sometido a las vibraciones mecánicas de la base o a las vibraciones mecánicas de la pipeta. Lo anterior, limita la resolución espacial de las mediciones en pinzas ópticas únicas. Para minimizar este problema, es que se han desarrollado las pinzas ópticas dobles. En las pinzas ópticas dobles, el sistema biológico está completamente desacoplado de la base que soporta el medio en donde se mantiene el espécimen de estudio. Esto se logra mediante la utilización de dos trampas ópticas de atrapamiento fuerte que son capaces de atrapar y mantener en suspensión ambos extremos del objeto. Lo anterior, aísla la medi-

ción de ruidos mecánicos, haciendo al sistema menos sensibles a las derivas mecánicas y vibraciones del ambiente que pueden ser transmitidas a la muestra a través de la optomecánica. En consecuencia, el diseño implementado en este trabajo, basado en el montaje y análisis desarrollado por Moffitt [10–16] y otros trabajos similares [113], permite minimizar, entre otros, los ruidos mecánicos que puedan sufrir las señales obtenidas desde dos haces de atrapamiento ortogonalmente polarizados usados para mediciones típicamente de moléculas únicas [5, 10, 113]. Las características de diseño este tipo de instrumentación, más la capacidad que entrega trabajar con coordenadas diferenciales [10], permite mejorar potencialmente la resolución espacial en comparación a otros esquemas de pinzas ópticas tales como los de pinzas únicas. En este sentido, resoluciones subnanométricas han sido obtenidas con este tipo de instrumentación [5, 10, 113].

En la figura 3.8, se presenta el montaje de las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte para detección mediante coordenadas diferenciales implementado para este trabajo, en donde a continuación, se detallan sus diferentes subsistemas y componentes optomecánicos, los cuales, son similares a los presentados para la técnica TRMFS de doble haz mostrados en la sección 3.3. Nuevamente es usado un sistema de control de potencia compuesto por el sistema HWP1-PBS1-HWP2, donde HWP1 (AHWP05M-980, Thorlabs Inc.) Y HWP2 (AHWP05M-980, Thorlabs Inc.) son láminas de media onda y PBS1 (CCM1-PBS253, Thorlabs Inc.) es un cubo polarizador. Sobre HWP1 incide un haz láser infrarrojo linealmente polarizado (Ventus, 5000 mW;  $\lambda = 1064$  nm, Quantum Laser) que evita daños sobre muestras biológicas [186]. Mediante la rotación de HWP1, se puede rotar la polarización incidente, produciendo que la proporción de las componentes horizontal y vertical cambie. A la salida de HWP1, el haz incide sobre el PBS1, transmitiéndose hacia HWP2 sólo la componente polarizada horizontalmente y descartándose la vertical. Esto es usado para controlar la potencia lumínica total que entra al sistema. Además, la rotación de la lámina HWP2 permite rotar la polarización del haz horizontalmente polarizado que incide sobre esta, permitiendo generar un haz de salida con componentes horizontal y vertical. Esto permite controlar la intensidad de las trampas ortogonales que luego se generarán. Adicionalmente, y de manera auxiliar, es dispuesto en caso de ser necesario, un filtro de densidad neutra NDF1 para controlar potencias dentro del sistema. La luz que emerge de HWP2 se encuentra con un telescopio expensor formado por L1 y L2 de focales  $f_1 = 50$  mm y  $f_2 = 250$  mm, respectivamente. Este telescopio aumenta el diámetro del haz incidente cinco veces su tamaño original permitiendo ajustar el tamaño del haz aproximadamente al diámetro de la entrada del plano focal trasero del lente objetivo OL1 (UPlanSApo, 60X/1.2 W.I., Olympus, Tokio, Japan). Este lente es responsable de formar las trampas ópticas en el plano de la muestra. Es relevante considerar que mientras más se ajuste la luz a la entrada del plano focal trasero del lente objetivo OL1, más fuertes y estables serán las trampas ópticas formadas en el plano de la muestra. Cuando la luz emerge del telescopio expensor, se encuentra con el sistema de generación y desplazamiento de dos trampas ortogonales. Esta luz polarizada linealmente se encuentra entonces con un cubo polarizador PBS2 (CCM1-PBS253, Thorlabs Inc.) el cual separa la componente horizontal de la vertical, generando dos haces ortogonalmente polarizados independientes. La luz de polarización horizontal incidirá entonces sobre el espejo piezoeléctrico PZM1 (KC1-T-PZ,

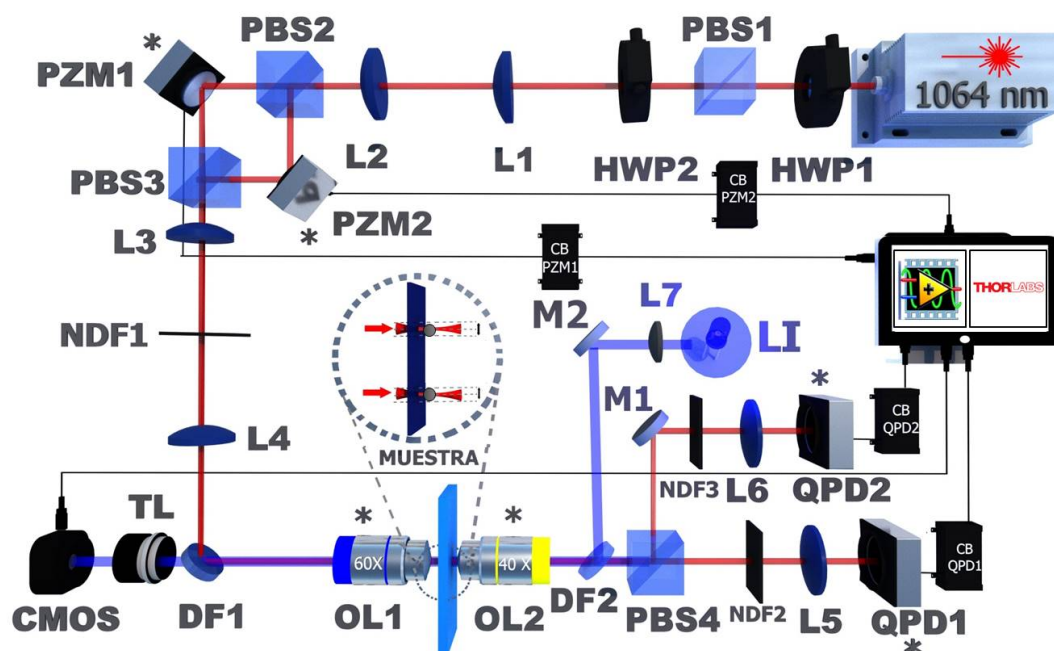


Figura 3.8: Esquema experimental implementado de pinzas ópticas dobles para detección mediante coordenadas diferenciales y uso de correlaciones. Un láser de  $\lambda = 1064$  nm incide sobre un sistema de control de potencia HWP1-PBS1-HWP2 compuesto por dos láminas de media onda, HWP1 Y HWP2, y un cubo polarizador PBS1. Un filtro de densidad neutra NDF1 auxiliar completa este sistema. Un telescopio expansor formado por L1 y L2 permiten ajustar el diámetro del haz. Un cubo polarizador PBS2 genera dos trampas ortogonalmente polarizadas. Los espejos piezoléctricos PZM1 y PZM2 en conjunto con PBS3, el telescopio de magnificación unitaria compuesto por las lentes L3 y L4, y el espejo dicróico DF1, permiten generar desplazamientos angulares en el plano focal trasero de OL1 y desplazamientos laterales de las dos trampas ortogonales formadas por este lente en el plano de la muestra. Ambas trampas funcionan en régimen de atrapamiento. La luz de las trampas es parcialmente dispersada por las esferas y forman un patrón de interferencia para cada trampa en el plano focal trasero de OL2. Un plano conjugado de este es formado para detectar las variaciones en los patrones de interferencia de cada trampa. La luz transmitida por PBS4 y la lente L5 forman el plano conjugado para el haz de polarización horizontal y la reflexión en PBS4, en el espejo M1, más el uso del lente L6, forman el plano conjugado para el haz de polarización vertical. Fotodetectores de posición QPD1 y QPD2 son posicionados en esos planos y serán sensibles sólo a perturbaciones en los haces debido a la posición de las esferas en cada trampa. Además, el plano de la muestra es visualizado al hacer pasar una fuente de iluminación azul LI por una lente L7, que al ser reflejada por un espejo M2 y un espejo dicróico DF2, se enfoca en el plano focal trasero de OL2. La luz viajará entonces de manera contrapropagante al láser infrarrojo, permitiendo que una lente de tubo TL y una cámara CMOS generen una imagen digital completamente iluminada del plano de la muestra. Elementos ópticos adicionales como los filtros de densidad neutra NDF2 y NDF3 son incorporados para evitar la saturación de las señales adquiridas mediante los fotodetectores QPD1 y QPD2. Fuente de imagen: elaboración propia.

Thorlabs Inc.) y la vertical sobre el espejo piezoeléctrico PZM2 (Nano-MTA2HS, Mad City Labs Inc.). Ambos haces son recombinados mediante un cubo polarizador PBS3 (CCM1-PBS253, Thorlabs Inc.) hacia un telescopio compuesto por L3 y L4 de focales idénticas (focales  $f_3 = 200$  mm y  $f_4 = 75$  mm, respectivamente), y emergen hacia un espejo dicróico DF1 (FF749-SDi01-25x36x3.0, Semrock) que refleja la luz hacia la entrada del plano focal trasero del lente objetivo OL1. El telescopio formado por los lentes L3 y L4 es de magnificación unitaria y no varía el diámetro de los haces que pasan a través de él. En este punto, es posible describir dos subsistemas desplazadores de haz, que de manera independiente, permiten el movimiento lateral de los haces de polarización horizontal y vertical en el plano de la muestra luego que son enfocados por el lente OL1. El primer subsistema permite el desplazamiento lateral del haz polarizado horizontalmente en el plano de la muestra y está formado por PZM1, el telescopio de magnificación unitaria y de manera auxiliar por DF1. Por su parte, el segundo subsistema permite el desplazamiento lateral del haz polarizado verticalmente en el plano de la muestra y está formado por PZM2, el telescopio de magnificación unitaria y también de manera auxiliar por DF1. Ambos subsistemas permiten conjugar los planos de los espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2 con la entrada del plano focal trasero de OL1. Para que esto suceda, L3 debe estar separado por su distancia focal de PZM1 y PZM2, L4 debe estar separado por su longitud focal del plano focal trasero de OL1, y las lentes L3 y L4 deben estar separadas por la suma de sus longitudes focales. Lo anterior, permite que rotaciones de los espejos piezoeléctricos generen movimientos angulares a la entrada del plano focal trasero de OL1, produciendo movimientos laterales de estos haces en el plano de la muestra al ser enfocados por este lente. Sin embargo, los movimientos angulares generados en el plano focal trasero de OL1 de los haces polarizados horizontal y vertical, no producirán cambios de la distribución de sus perfiles de intensidad en este plano. A continuación, un lente colimador OL2 (E Plan 40X/0.65, Nikon) es enfrentado con OL1 de manera que colecte la luz proveniente del plano de la muestra en donde son formadas las trampas ortogonales. La luz proveniente de estas trampas, es colimada por OL2. La luz emergiendo del plano focal trasero de OL2, es entonces dirigida hacia un espejo dicróico DF2 el cual transmite la luz hacia un cubo polarizador PBS4 (CCM1-PBS253, Thorlabs Inc.) que separa la información de la trampa de polarización horizontal de la vertical. La luz horizontalmente polarizada es transmitida por PBS4 y pasa por un lente L5 ( $f_5 = 150$  mm) que forma un plano conjugado del plano focal trasero de OL2 en donde se posiciona un fotodetector de posición QPD1. Por su parte, el PBS4 refleja la información de la trampa polarizada verticalmente hacia un espejo M1, el cual refleja la luz hacia el lente L6 ( $f_6 = 150$  mm) que también forma un plano conjugado del plano focal trasero de OL2 y en donde es dispuesto un QPD2. Tanto L5 como L6 son colocados a una distancia del doble de su longitud focal respecto del plano focal trasero de OL2 y, aproximadamente a esta misma distancia de separación, con respecto a sus correspondientes fotodetectores QPD1 y QPD2. Así, los planos de PZM1 y PZM2 quedan conjugados con los planos de los fotodetectores QPD1 y QPD2, respectivamente, y a la vez, los planos de PZM1 y PZM2 quedan conjugados con el plano focal trasero de OL1 y el de OL2. Lo anterior, permite que los fotodetectores sólo sean sensibles a perturbaciones en las trampas producidas por la muestra de estudio y no a los desplazamientos laterales de cada una de ellas. De manera adicional, se incorporan al sistema



de detección dos filtros de densidad neutra, NDF2 y NDF3, asociados a los fotodetectores QPD1 y QPD2, respectivamente. Estos filtros evitan que las señales de los fotodetectores se saturen. Finalmente, un sistema de iluminación es incorporado al montaje para formar una imagen del plano de la muestra. Para lograr esto, una fuente de iluminación azul LI es enfocada por un lente L7 ( $f_7 = 400$  mm) sobre el plano focal trasero de la lente OL2 con la ayuda de un espejo M2 y un espejo dicróico DF2, generando iluminación Köhler en el plano de la muestra [12]. De esta manera, la iluminación viajará de forma contrapropagante a la luz infraroja, emergiendo por OL1 e incidiendo sobre un lente de tubo TL, que junto a una cámara CMOS (DMCC1545, monocromática, Thorlabs Inc.), permitirá formar una imagen digital completamente iluminada del plano de la muestra. Para una mejor comprensión del sistema, los subsistemas más relevantes del esquema de doble pinza óptica son descritos un poco más en detalle.

## Láser

El sistema cuenta con un láser de alta potencia debido a las importantes pérdidas de potencia generada por los elementos ópticos antes de que, los haces que forman las trampas, lleguen al plano de la muestra. El láser utilizado es infrarrojo (IR) para evitar daños sobre los especímenes de estudio y objetos de atrapamiento [186]. Este, cuenta con una potencia de salida máxima nominal de 5 W (Ventus, 5000 mW;  $\lambda = 1064$  nm, Quantum Laser). Para este esquema de pinzas ópticas dobles, este láser se utiliza a altas potencias, no sólo para compensar las pérdidas de intensidad en el sistema, sino también, para generar fuerzas de atrapamiento altas. Además, si bien este láser cuenta con una estabilidad espacio-temporal de potencia acorde a las necesidades, se consideró la utilización de un aislador óptico a su salida debido a que, reflexiones producidas en el sistema al operar a altas potencias, pueden ser devueltas al láser y producir inestabilidades en su emisión. Emisiones estables del láser indicadas por su fabricante son conseguidas al operar con una inyección de corriente sobre el 40 %, indicada en su caja de control. Lo anterior es equivalente a emisiones de intensidad óptica sobre 1W. Adicionalmente, al igual que en 3.3, el láser fue conectado a un equipo de enfriamiento por agua (Chiller UC160-190, Solid State Cooling System). Lo anterior, permitió mantener su temperatura estable y dentro de un rango adecuado de operación durante la emisión.

## Sistema de control de potencia

El sistema de control de potencia está conformado por tres elementos fundamentales, correspondientes al conjunto HWP1-PBS1-HWP1. Los elementos HWP1 y HWP2 corresponden a láminas de media onda y el PBS1 a un cubo polarizador. Sobre HWP1 incide el haz linealmente polarizado del láser. El giro de esta lámina permite rotar la polarización lineal del haz de manera que, al incidir el haz sobre el cubo PBS1, sólo se transmita la componente de polarización horizontal y se refleje la vertical. Esto permite controlar la potencia de entrada al sistema. La luz con polarización horizontal transmitida entonces incide sobre HWP2, que mediante su rotación, permite generar un haz de salida que contenga dos componentes de polarización, vertical y horizontal. Esto asegura el control de

la potencia de dos haces ortogonalmente polarizados que luego son generados para formar las trampas ópticas. Un elemento auxiliar para controlar la potencia es el filtro NDF1, el que puede ser usado de manera multipropósito.

### Telescopio expansor

A la salida de la lámina de media onda HWP2, un conjunto de dos lentes convergentes son dispuestos para formar un telescopio expansor compuesto por las lentes L1 y L2. Este telescopio, permite ajustar el diámetro del láser incidente en su entrada con el diámetro de entrada del plano focal trasero del lente objetivo OL1. Este ajuste se realiza pues OL1 es el lente encargado de formar las dos trampas ópticas en el plano de la muestra a partir de dos haces ortogonalmente polarizados. Por lo anterior, es necesario tener presente que mientras mejor ajuste el diámetro de los haces al diámetro de la entrada del plano focal trasero de OL1, mejor será la estabilidad y fuerza de las trampas generadas. Esto implica, que se debe utilizar toda la apertura numérica del lente objetivo OL1 para formar las trampas en el plano de la muestra. Es así que, las lentes L1 y L2 de focales  $f_1 = 50$  mm y  $f_2 = 250$  mm, son escogidas para magnificar cinco veces el diámetro del haz incidente sobre este telescopio, ajustando aproximadamente a un diámetro de entrada, en el plano focal trasero de OL1, de  $\sim 8$  mm.

### Sistema de generación y control de desplazamiento de trampas fuertes ortogonales

Luego del telescopio expansor, un haz con polarización lineal formado por dos componentes, vertical y horizontal, incide sobre el sistema de generación y control de trampas débiles ortogonales. Este sistema está compuesto por dos cubos polarizadores, PBS2 y PBS3, dos espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2, un telescopio de magnificación unitaria y, de manera auxiliar, un espejo dicróico DF1. La luz proveniente del telescopio expansor llega a un PBS2 que separa las componentes de polarización que trae la luz. Esto genera dos haces ortogonalmente polarizados e independientes, uno horizontal y el otro vertical. El haz polarizado horizontalmente, incide sobre PZM1 y el vertical sobre PZM2. Estos haces son recombinados mediante un PBS3, emergiendo ambos hacia un telescopio de magnificación unitaria formado por dos lentes convergentes, L3 y L4, los cuales tienen la misma longitud focal (focales  $f_3 = 150$  mm y  $f_4 = 150$  mm, respectivamente). Estos valores permiten que, los haces que pasan a través de él, no cambien sus diámetros. Luego, ambos haces emergiendo desde el telescopio inciden sobre un espejo dicróico DF1 el cual los refleja hacia el plano focal trasero de OL1. Como ya se ha indicado, en este punto es posible identificar dos subsistemas que son responsables de permitir el desplazamiento lateral en el plano de la muestra de las dos trampas formadas a partir de los haces que llegan al plano focal trasero de OL1. Un primer subsistema está conformado por PZM1, el telescopio de magnificación unitaria y un elemento auxiliar DF1. Esto permite conjugar el plano de PZM1 con el plano focal trasero del lente OL1 para generar desplazamientos del haz polarizado horizontalmente en el plano de la muestra. Un segundo subsistema es el formado por PZM2, el telescopio de magnificación unitaria y el elemento auxiliar DF1.



Este permite conjugar el plano de PZM2 con el plano focal trasero del lente OL1. Para ambos subsistemas, dada las focales de las lentes L3 y L4, se forma un sistema  $4f$  entre los planos de PZM1 y PZM2 con el plano focal trasero de OL1. Entonces, los movimientos angulares de PZM1 y PZM2 serán trasladados al plano focal trasero de OL1, generando finalmente movimientos laterales de las trampas formadas en el plano de la muestra a partir de los dos haces ortogonalmente polarizados. Esto hecho tiene particular relevancia al momento de las mediciones realizadas con este sistema. La razón de esto es que, tal como se ha indicado en la sección 3.2, si bien rotaciones de PZM1 y PZM2 generan rotación de los haces en el plano focal trasero de OL1 la distribución de intensidad de cada uno de ellos no cambia en ese plano. Otro aspecto relevante a considerar es que, en principio para experimentos típicos sobre especímenes biológicos, sólo una de las trampas será desplazada. Esta será la trampa asociada al espejo PZM2, es decir, a la trampa verticalmente polarizada. Por lo anterior, el espejo PZM2 tiene capacidades de rotación y resolución de pasos individuales mayores a las de PZM1. Es así que PZM2 posee un rango angular de rotación  $2 \text{ mrad}$  con resolución de paso de  $4 \text{ nrad}$  en comparación a PZM1 que posee un rango angular de  $\pm 73 \text{ } \mu\text{rad}$  y pasos de  $0.3 \text{ } \mu\text{rad}$ . Además, otra razón para no mover la trampa asociada a PZM1 es que podrá simular el hecho de que uno de los extremos del espécimen estudiado debe estar adherido a una superficie. La operación bajo estas condiciones, aislará las mediciones de posición de las trampas de posibles ruidos mecánicos asociados a los soportes que sostienen la muestra. Las capacidades del subsistema de desplazamiento asociada a PZM2 permitirá entonces desplazamientos de varios micrometros de la trampa verticalmente polarizada en el plano de la muestra, suficiente para estudio de molécula única, estiramiento de hebras de ADN y glóbulos rojos.

### Sistema de soporte de muestra

Si bien usar pinzas ópticas dobles permite aislar a las mediciones de posición de las trampas de los movimientos mecánicos de los soportes que sostienen la muestra, se deben tener consideraciones de diseño respecto a esto. En la práctica, es necesario desplazar el portamuestra que contiene el objeto de estudio, tanto para efectos de calibración como para el posicionamiento dentro de zonas de interés. De acuerdo a lo anterior, se usaron actuadores motorizados (Z812B, Thorlabs Inc.) en las bases de traslación micrométricas (Thorlabs) los cuales pueden ser operados mediante cubos de control servo (KDC101, Thorlabs Inc.). Lo anterior, permiten controlar la velocidad de desplazamiento y la posición de los actuadores, tanto de manera manual como programada. Estos elementos posibilitan la traslación del portamuestra de manera tridimensional. Así, los ejes X e Y están asociados a desplazamientos en el plano de la muestra, y Z, al ajuste del portamuestra con respecto al lente objetivo OL1. Además, este último eje permite enfocar la imagen digital de la muestra formada en la cámara CMOS mediante elementos de iluminación y formadores de imagen.

## Sistema de detección diferencial

Para mediciones de alta sensibilidad y resolución temporal en esquemas de pinzas ópticas dobles, es usada típicamente la detección en la técnica de interferometría de plano focal trasero BFPI [4, 5, 10, 113]. Por lo anterior, se ha implementado este tipo de detección en el esquema presentado en la figura 3.8. Este sistema está compuesto por un lente objetivo OL2, un cubo polarizador PBS4, un espejo M1, las lentes L5 y L6 y los fotodetectores de posición QPD1 y QPD2. Este conjunto trabaja de forma solidaria con los sistemas de desplazamiento de haces, con el lente objetivo OL1 y utiliza de manera auxiliar un espejo dicróico DF2 y filtros de densidad neutra NDF2 y NDF3 para control de intensidad lumínica.

El principio de funcionamiento del sistema de detección aprovecha el hecho de que, al igual a como se indica en las secciones 3.2 y 3.3, los planos de PZM1 y PZM2 se encuentran conjugados con del plano focal trasero de OL1. Como ya se indicó, esto tiene como consecuencia que los movimientos angulares de los haces producidos por las rotaciones de PZM1 y PZM2, y que son trasladados al plano focal trasero de OL1, no cambian la distribución de intensidad de los haces cuando llegan al plano focal trasero de OL1. Este hecho es aprovechado para la detección al colocar el lente colimador OL2 enfrente de OL1. El lente OL2 captura la luz desde el plano de la muestra y la proyecta colimada a través de su plano focal trasero. De esta manera, los planos focales traseros de OL1 y OL2 se encuentran conjugados. Dado esto último, y que la distribución de intensidad de los haces justo en el plano focal trasero de OL1 no varía, entonces la luz emergiendo desde el plano focal trasero de OL2 no será sensible a cambios de posición de las trampas en el plano de la muestra pero sí será sensible a las perturbaciones producidas por elementos atrapados por cada una de ellas. Estas perturbaciones generarán un patrón de difracción para cada una de las trampas justo en el plano focal trasero de OL2, y su distribución de intensidad, variará de manera dinámica en función de cuán desplazado se encuentre el objeto atrapado respecto al centro de la trampa. El objeto directamente atrapado típicamente será una esfera de poliestireno. Conceptualmente, es relevante tener presente que el patrón de interferencia se da por luz parcialmente dispersada y no dispersada por el objeto de fase atrapado en cada una de las trampas. La luz colimada saliendo de OL2 entonces incide, luego de pasar por un espejo dicróico DF2, sobre un PBS4 que se encarga de separar las componentes de polarización horizontal y vertical. Cada componente está asociada a la información correspondiente a cada una de las trampas. La componente horizontal entonces se transmite directo hacia un lente L5 de focal  $f_5 = 150$  mm el cual se encuentra separado por el doble de su longitud focal respecto al plano focal trasero de OL2. A esta misma distancia de separación, el lente L5 forma un plano conjugado del plano focal trasero de OL2, en donde es colocado un fotodetector de posición QPD1. Por su parte, el PBS4 refleja la componente de la luz polarizada verticalmente hacia un espejo M1 que refleja la luz hacia un lente L6. Este lente de focal  $f_6 = 150$  mm también está separado por el doble de su longitud focal respecto del plano focal trasero de OL2. Luego, a esta misma distancia, L6 forma un plano conjugado del plano focal trasero de OL2 en donde se coloca un fotodetector de posición QPD2. De esta manera, el plano de QPD1, los planos focales traseros de OL2 y

OL1, y el plano de PZM1, se encontrarán conjugados, todos ellos asociados a la medición de la trampa horizontalmente polarizada. De la misma manera, el plano de QPD2 estará conjugado con los planos traseros de OL1 y OL2 como también con el plano de PZM2, todos ellos asociados a la medición con la trampa polarizada verticalmente. Un aspecto importante a tener en cuenta en el proceso de detección, será evitar que las señales de los fotodetectores se saturen, es decir, que reciban una cantidad de luz sobre su límite permitido. Para esto, son utilizados los filtros de densidad neutra NDF2 y NDF3, asociados a los detectores QPD1 y QPD2, respectivamente. La elección de estos debe permitir que a ambos detectores llegue la misma cantidad de potencia lumínica y que se encuentre bajo el límite máximo de los detectores. Lo anterior, tendrá como consecuencia que las señales permitan detectar cambios en el patrón de interferencia asociado a cada trampa.

### Sistema de visualización

Un conjunto de elementos ópticos es incorporado al sistema de pinzas ópticas con el objetivo de observar el plano de la muestra, plano en donde se encuentra el objeto de estudio y las trampas ópticas generadas. Este se encuentra compuesto por una fuente de iluminación azul LI que es enfocada sobre el plano focal trasero de OL2 mediante una lente L7 de focal  $f_7 = 400$  mm y la ayuda de un espejo M2 y un espejo dicroico DF2. Enfocar la iluminación en el plano mencionado, permite generar iluminación Köhler sobre el plano de la muestra [12]. La luz viaja entonces de manera contrapropagante a la luz infraroja, pasando por OL2 y saliendo desde el plano focal trasero de OL1 hacia un espejo dicroico DF1. Este espejo transmite la luz hacia un lente de tubo TL que permite, junto a una cámara CMOS (Thorlabs, DMCC1545, monocromática), la formación de una imagen digital completamente iluminada del plano de la muestra. En esta imagen se puede visualizar entonces la muestra y ambas trampas, las cuales son observables debido a que, una porción pequeña de la luz de los haces enfocados en el plano de la muestra, son reflejados por la cámara portamuestra que contiene el espécimen de estudio. Filtros complementarios, como un filtro infrarojo, pueden ser utilizados entre la cámara CMOS y TL para eliminar de la imagen la visualización de ambas trampas, y así, observar sólo la muestra o espécimen de estudio.

# Capítulo 4

## Desarrollo experimental

En el presente capítulo, se presentan los detalles acerca de los diferentes elementos y metodologías utilizadas para implementar y medir usando las herramientas basadas en TRMFS y en pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. De manera breve, abajo se describe un listado de las principales tareas y protocolos realizados para la implementación y las mediciones experimentales mediante estas herramientas.

**Caracterización del láser** . Selección de fuente láser por sus características de estabilidad espacio-temporales y caracterización de su curva de potencia.

**Interfaces de medición y adquisición de datos** . Control de desplazamiento de espejos piezoeléctricos y adquisición coordinada de datos.

**Calibración del desplazamiento de los haces en el plano de la muestra** . Determinación experimental del tamaño de píxel y cálculo del desplazamiento de los haces en el plano de la muestra para cada experimento realizado.

**Protocolos de preparación de muestras** . Protocolos de preparación de muestras y cámaras portamuestra, tanto para estudios biológicos (en experimentos de TRMFS) como para el atrapamiento de objetos (en pinzas ópticas dobles en régimen de atrapamiento fuerte).

**Determinación de planos conjugados** . Procedimiento para asegurar correcto posicionamiento de fotodetectores de cuatro cuadrantes QPD.

**Experimentos, curvas de calibración, factores de conversión y medición** . Definición de experimentos a realizar, procedimientos de conversión de señales de fluctuación desde voltaje a nanómetros y detalles de adquisición y procesamiento de las mediciones.

Cada uno de estos pasos, indicados arriba, son descritos a continuación en términos de cómo fueron realizados y los detalles que se deben tener en cuenta en su ejecución.

## 4.1. Caracterización de láser y sus propiedades

Dado que los experimentos implementados apuntan a obtener resoluciones del orden de los nanómetros o menores (sub-nanómetros), la estabilidad de la fuente de iluminación utilizada para realizar las mediciones es fundamental. En este sentido, características como la gaussianidad de su perfil, y su estabilidad en potencia, entre otras, son características deseables. En particular, una fuente láser infrarroja (Ventus HP, 5000 mW,  $\lambda = 1064$  nm), que cumple con este tipo de características, fue escogida para todos los montajes experimentales. Sus principales características certificadas por el fabricante son resumidas en la tabla 4.1.

<b>Características Láser Ventus 1064, Quantum Laser</b>	
Longitud de onda	1064 nm
Potencia máxima	5 W
Diámetro de Haz	$2.4 \pm 0.2$ mm
Modo espacial	TEM <sub>00</sub>
Elipticidad	< 1:1.2
Ancho de banda	80 GHz
Divergencia	< 0.6 mrad
M <sup>2</sup>	< 1.4
Estabilidad de Potencia (RMS)	< 0.2 %
Estabilidad del punto del haz	< 5 $\mu$ rad
Ruido (RMS)	< 0.2 %
Polarización	Vertical
Ángulo de haz	< 1 mrad
Longitud de coherencia	4 mm

Tabla 4.1: Principales características del láser utilizado para la operación en experimentos basados en TRMFS y pinzas ópticas dobles en régimen de alta potencia para atrapamiento. Tabla de elaboración propia en base a características provistas por el fabricante.

El láser escogido y sus características son las mismas que el utilizado en montajes de pinzas ópticas para el uso de coordenadas diferenciales [10–16], en donde su estabilidad ya se ha puesto a prueba. Sin embargo, es necesario caracterizar su curva de potencia en función de la corriente suministrada a través de su caja de control, para de esta manera, conocer los valores de operación que aseguran la estabilidad de esta fuente lumínica de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Por lo anterior, a continuación es presentada la curva de potencia del láser en función del porcentaje de corriente que inyectada por la caja de control.

### 4.1.1. Caracterización de potencias de operación

Cómo ya se ha indicado en las secciones 3.2, 3.3 y 3.4, el láser es operado mediante una caja de control. Esta indica, y permite controlar, el porcentaje de corriente que se le suministra al láser para su operación,  $C_{\text{CONTROL}}$ . Así, un porcentaje de corriente determinado se traduce en una potencia lumínica real a la salida del láser  $P_{\text{LÁSER}}$ . De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, la emisión del láser cumplirá las características de estabilidad de la tabla 4.1 cuando el porcentaje de corriente suministrada al láser sea  $C_{\text{CONTROL}} \geq 40\%$ . Bajo esta condición, el láser será emitido con las características de estabilidad espacio-temporales deseadas. Estas condiciones de operación son válidas independiente de la técnica utilizada. Será relevante entonces tener claridad de la relación que existe entre  $C_{\text{CONTROL}}$  y  $P_{\text{LÁSER}}$  ya que indicará, según la técnica, los niveles de atenuación que se deben lograr en cada una de las técnicas. Esta relación es mostrada de manera explícita en la figura 4.1

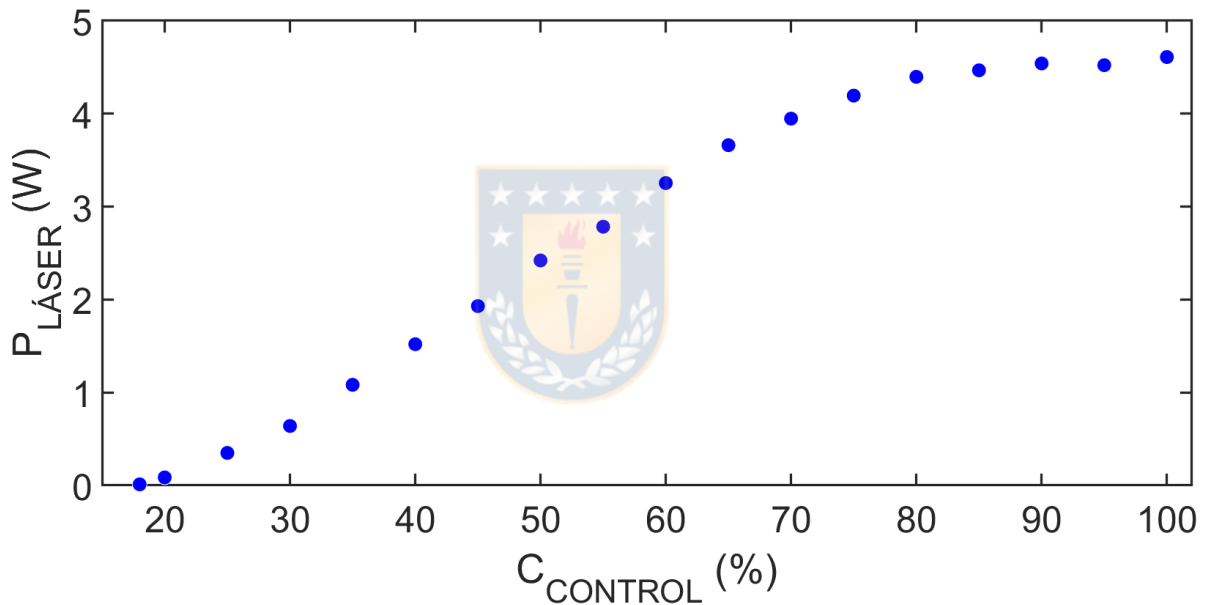


Figura 4.1: Relación entre la corriente indicada en la caja de control del láser,  $C_{\text{CONTROL}}$ , y la potencia real de salida del láser,  $P_{\text{LÁSER}}$ . El parámetro  $C_{\text{CONTROL}}$  es indicado en porcentaje de corriente suministrada al láser. Corrientes de control  $C_{\text{CONTROL}}$  mayores a 40% son necesarias para que el láser opere de manera estable según el fabricante. Este límite inferior de porcentaje de corriente es considerado al momento de hacer las mediciones.

La figura 4.1 muestra que el  $C_{\text{CONTROL}}$  mínimo de operación, para asegurar estabilidad de potencia, corresponde a potencias de salida del láser,  $P_{\text{LÁSER}}$ , mayores a  $\sim 1.5$  W. Así, para la aplicación de la técnica de TRMFS son usadas potencias de operación en este límite. En este caso la potencia debe ser atenuada de manera que cada haz incidente en el plano focal trasero de OL1, de acuerdo a figuras 3.6 y 3.7 haces, llegue con potencias  $\leq 1$  mW. Lo anterior asegura evitar efectos de atrapamiento. Para el caso de pinzas dobles

de atrapamiento fuerte, las potencias en el plano focal trasero de OL1, de acuerdo a lo mostrado en figura 3.8, pueden ser elevadas ya que la fuerza de atrapamiento dependerá de la intensidad. Para esto, se podrán usar corrientes de operación muy por sobre el límite mínimo de 40 % establecido por el fabricante.

## 4.2. Interfaces de medición y adquisición de datos

Para la calibración y adquisición de datos mediante las herramientas implementadas en este trabajo, fue necesario desarrollar interfaces de control y adquisición de datos en el software de programación Labview (National Instruments, NI, USA). Estas interfaces fueron desarrolladas de acuerdo a las necesidades particulares de los experimentos realizados en cada una de las implementaciones, tanto para las relacionadas con TRMFS como para pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. A continuación, se describen brevemente las principales características de las interfaces desarrolladas y utilizadas en cada implementación experimental.

### 4.2.1. Interfaz de control y medición para TRMFS de haz único

La técnica de TRMFS de haz único, mostrada en la figura 3.6, fue implementada para el estudio de los efectos protectores del resveratrol en los glóbulos rojos. Para esto, se realizaron mediciones de fluctuación de membrana en un sólo punto de cada glóbulo bajo estudio. Así, la implementación de esta herramienta considera sólo un haz de medición, sobre el cual, es necesario tener control. Para conseguir lo anterior, una interfaz de control como la presentada en la figura 4.2 fue desarrollada en Labview (National Instruments, NI, USA). Su comunicación con el controlador (MDT693B, Thorlabs Inc.) del espejo piezoeléctrico PZM (KC1-T-PZ, Thorlabs Inc.), permite tener control de las señales de voltaje aplicadas sobre los ejes X e Y de este último. Por su parte, esta interfaz está comunicada a la caja controladora del QPD1 (TPA101, Thorlabs Inc.) mediante un conector de bloque I/O (SCC-68, National Instruments, NI, USA) y una tarjeta de adquisición DAQ (PCI 6024E, National Instruments, NI, USA). Esto convierte las señales del QPD1 (PDQ80A, Thorlabs Inc.) desde de análogo a digital (A/D), permitiendo la adquisición y extracción de datos de la señal de fluctuación de membrana del glóbulo rojo medido.

De acuerdo a la figura 4.2A, cuando en (1) el interruptor de la interfaz se encuentra encendido (ON: Voltaje Automático), el programa permite aplicar un barrido de voltajes sobre un espejo piezoeléctrico PZM. Este, controla la posición en el plano de la muestra del haz usado para la medición de fluctuaciones. El barrido permite aplicar un rango de voltajes de 0 – 150 V con un paso de avance bien definido en (2), y además, es aplicado sobre uno de los ejes del PZM que puede ser definido en (3). De manera complementaria, el avance del voltaje sobre el PZM puede ser visualizado en (4). Este barrido es utilizado para realizar la calibración del sistema, es decir, para obtener un factor de conversión que permita convertir las señales obtenidas mediante el QPD1 desde voltaje a nanómetros. Esta calibración exige que desplazar el haz de medición, en el plano de la muestra, desde



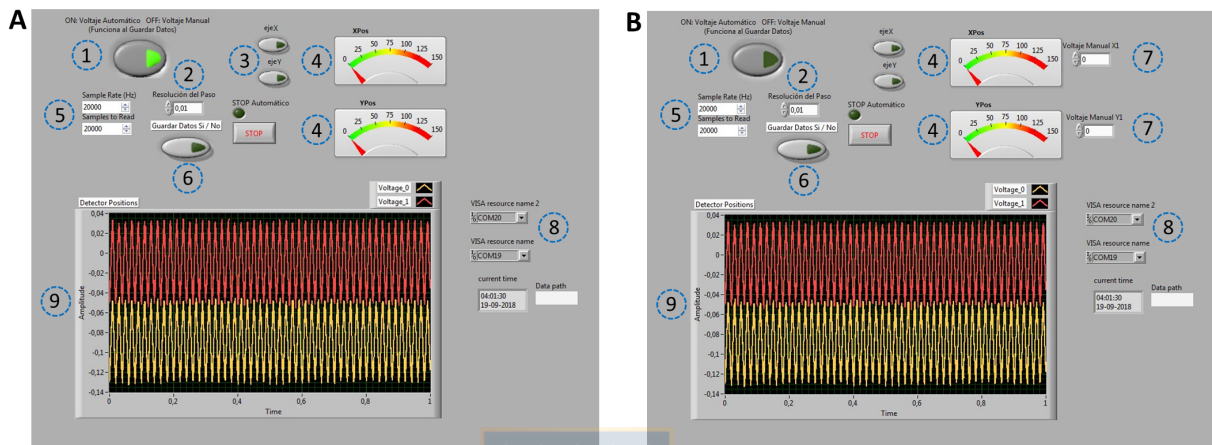


Figura 4.2: Interfaz de control y adquisición de datos para calibración y medición en un sistema de TRMFS de haz único. Esta fue utilizada para el estudio de los efectos protectores del resveratrol en glóbulos rojos. **A** Funcionamiento de la interfaz de control y adquisición de datos funcionando en modo automático (1). Este modo permite la aplicación de un barrido de voltajes en el rango de 0 – 150 V sobre el PZM que maneja la posición del haz de medición en el plano de la muestra. Los pasos del barrido pueden ser definidos (2) y aplicados a ambos ejes del PZM (3). Por su parte, el avance del barrido puede ser visualizado para ambos ejes (4). Este modo es usado para la calibración del sistema. **B** Funcionamiento de la interfaz en modo manual que permite aplicar voltajes fijos al PZM tanto para su eje X como Y (7). Este modo es usado para la fase de medición de fluctuaciones de membrana. Adicionalmente, la interfaz permite definir las características de la adquisición de datos (5) y cuándo esta comienza (6), tanto para el modo automático como manual. La interfaz, cuenta además con selectores de puerto (8) para la conexión del QPD1 y la caja controladora del PZM, y también, con el despliegue en tiempo real de las señales de los ejes X e Y adquiridas por el QPD1 (9). Imagen de elaboración propia.

afuera hacia adentro del glóbulo para encontrar una curva con una zona lineal. Esta zona permite la obtención de un factor de conversión para transformar la señal de fluctuación obtenida con el QPD desde voltaje a nanómetros. Detalles acerca del proceso de calibración serán expuestos más adelante. Por otro lado, la tasa de muestreo (Sample Rate) y la cantidad de muestras adquiridas (Samples to read) en cada paso del barrido de voltajes pueden ser definidas como es mostrado en (5). Esto define el intervalo de tiempo entre cada paso de voltaje aplicado al PZM. Además, es posible seleccionar en (6) si se desean guardar los datos de las señales del QPD1 durante el barrido de voltaje sobre PZM.

Por otro lado, de acuerdo a la figura 4.2B, cuando en (1) el interruptor de la interfaz se encuentra apagado (OFF: Voltaje Manual), la interfaz despliega dos cuadros para aplicar manualmente un voltaje fijo en X e Y, como es mostrado en (7). Este modo manual de aplicación del voltaje es utilizado para realizar las mediciones de fluctuación del glóbulo rojo. Adicionalmente, la interfaz posee en (8) unos selectores de puertos para la conexión del QPD1 y la caja controladora del PZM, y además, entrega la posibilidad de observar en tiempo real las señales del QPD1 tanto para sus ejes X con para el Y, tal como se muestra en (9). Detalles acerca de los procesos de calibración y adquisición de datos, realizados utilizando esta interfaz, serán detallados posteriormente.

#### 4.2.2. Interfaz de control y medición para TRMFS de doble haz

La técnica de TRMFS de doble haz, mostrada en la figura 3.7, fue implementada para el estudio de los efectos de los diferentes niveles de glucosa sobre los glóbulos rojos. Para esto, fueron medidas sus fluctuaciones de membrana en dos puntos simétricamente separados. Debido a esto, la implementación de esta herramienta considera dos haces para la medición, por lo que es necesario tener control sobre ambos. Para conseguir lo anterior, fue desarrollada una interfaz de control como la presentada en la figura 4.3. Esta fue desarrollada en Labview (National Instruments, NI, USA), y mediante su comunicación con dos controladores (MDT693B, Thorlabs, Inc.) asociados a los espejos piezoeléctricos PZM1 (KC1-T-PZ, Thorlabs Inc.) y PZM2 (KC1-T-PZ, Thorlabs Inc.), permite tener control de las señales de voltajes aplicadas sobre estos en los ejes X e Y. Por su parte, esta interfaz está comunicada a las cajas controladoras del QPD1 (TPA101, Thorlabs Inc.) y QPD2 (TPA101, Thorlabs Inc.) mediante un conector de bloque I/O (SCC-68, National Instruments, NI, USA) y una tarjeta de adquisición DAQ (PCI 6024E, National Instruments, NI, USA). Esto realiza una conversión A/D de las señales del QPD1 (PDQ80A, Thorlabs Inc.) y QPD2 (PDQ80A, Thorlabs Inc.) permitiendo la adquisición y extracción de datos de las señales de fluctuación de membrana asociadas a ambos haces de medición.

De acuerdo a la figura 4.3, cuando el interruptor de la interfaz se encuentra encendido (ON: Voltaje Automático), el cual es señalado en (1), el programa permite aplicar un barrido de voltaje sobre los espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2 utilizando pasos de voltaje definidos. Tanto el rango de voltajes del barrido como la magnitud del paso, pueden ser ingresados en (2). Por su parte, los ejes sobre los cuales se aplicará el barrido pueden ser definidos en la pestaña (3) de la interfaz. Esta pestaña permite la selección individual

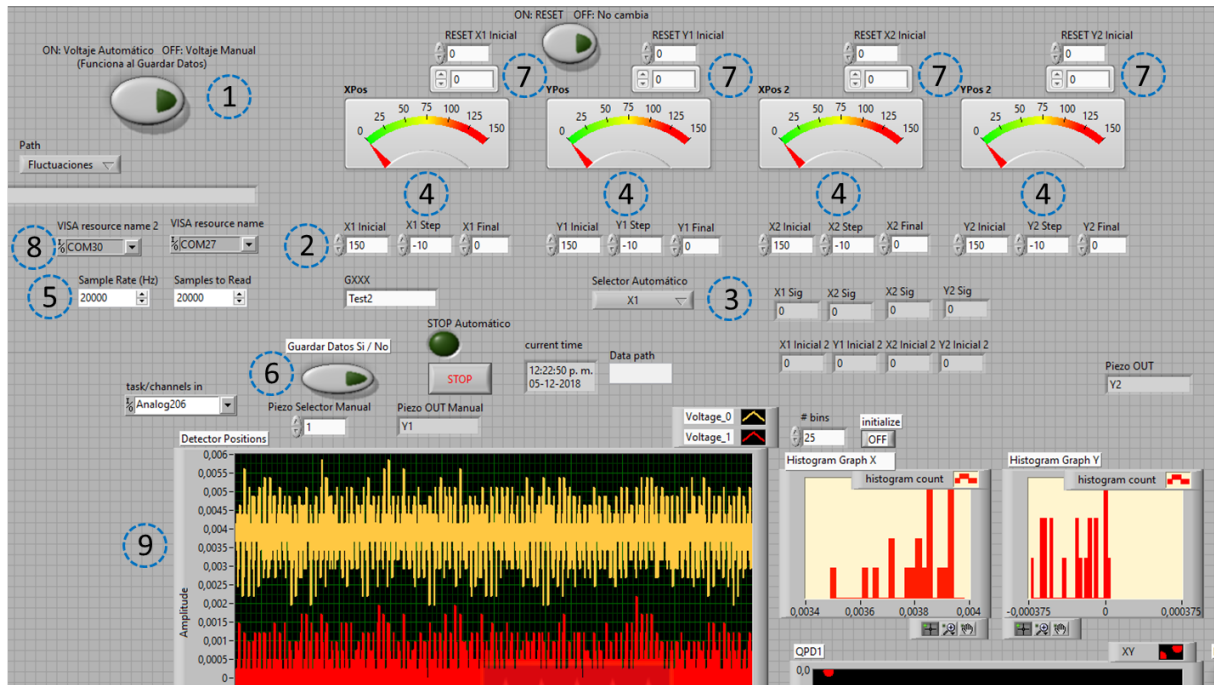


Figura 4.3: Interfaz de control y adquisición de datos para calibración y medición en un sistema de TRMFS de doble haz. Esta es utilizada para el estudio de los efectos de la glucosa en glóbulos rojos. El funcionamiento de la interfaz de control y adquisición de datos en modo automático (1) permite la aplicación de un barrido de voltaje sobre los espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2 que manejan la posición de los haces de medición en el plano de la muestra. Los pasos del barrido pueden ser definidos (2) para los ejes X e Y de los espejos piezoeléctricos. Los ejes de los espejos piezoeléctricos a los cuales se le aplicará el barrido pueden ser escogidos en (3) y el avance del barrido en cualquier eje puede ser visualizado (4). Este modo es usado para la calibración del sistema. Las tasas de adquisición y la cantidad de datos de las señales monitoreadas pueden ser definidas en (5) en donde un interruptor permite comenzar la adquisición de datos (6), tanto para el modo automático como manual escogido en (1). Por su parte, la operación de la interfaz en modo manual, permite aplicar voltajes fijos a los ejes X e Y de cualquiera de los piezoeléctricos (7). La aplicación de estos voltajes deja a los haces de medición en una posición fija sobre el glóbulo rojo. Esto permite realizar mediciones en una zona del glóbulo en donde las fluctuaciones de membrana se relacionan linealmente con la señal generada en cada QPD. Por lo anterior, este modo es usado para la fase de medición de fluctuaciones de membrana. Elementos adicionales como la elección de los puertos de conexión de los controladores de los fotodetectores y espejos piezoeléctricos (8), como también, la visualización en tiempo real de las señales X e Y de ambos fotodetectores (9), han sido consideradas. Imagen de elaboración propia.

de los ejes X e Y de cualquiera de los espejos piezoeléctricos, como también, permite la aplicación coordinada y sincrónica del barrido de voltaje para combinaciones de ejes. Un ejemplo de esto último, es que la pestaña permite seleccionar la opción X1X2, lo cual hace posible el movimiento sincrónico de los haces asociados a PZM1 y PZM2 en el eje X del plano de la muestra (movimiento horizontal). Por su parte, el avance en tiempo real del voltaje que está siendo aplicado a PZM1 y PZM2 durante el barrido, puede ser visualizado en (4). El barrido de voltaje aplicado a los espejos piezoeléctricos, PZM1 y PZM2, es utilizado para realizar la calibración del sistema, es decir, para obtener un factor de conversión que permita convertir las señales obtenidas mediante el QPD1 y QPD2 desde volt a nanómetros. Esta calibración exige desplazar cada uno de los haces de medición en el plano de la muestra, desde afuera hacia adentro del glóbulo, para así, encontrar una señal en cada fotodetector que muestre una curva con una zona lineal. Esta zona permite la obtención de un factor de conversión para convertir la señal de fluctuación obtenida con el QPD desde voltaje a nanómetros. La tasa de muestreo (Sample Rate) y la cantidad de muestras adquiridas (Samples to read) en cada paso del barrido de voltajes pueden ser definidas como es mostrada en (5). Esto define el intervalo de tiempo entre cada paso de voltaje aplicado. Adicionalmente, es posible seleccionar si se desean guardar los datos de las señales de los fotodetectores utilizados durante el barrido de voltaje, lo cual es indicado en (6).

Por otro lado, cuando el interruptor de la interfaz se encuentra apagado (OFF: Voltaje Manual), el cual es señalado en (1), es posible aplicar un voltaje manual fijo a cada eje de ambos espejos piezoeléctricos, PZM1 y PZM2, como es mostrado en (7). Los datos obtenidos mediante los fotodetectores en esta situación también pueden ser guardado al pulsar el interruptor indicado en (6). Este modo manual de aplicación del voltaje es utilizado para realizar las mediciones de fluctuación del glóbulo rojo. Al realizar el barrido de voltaje y encontrar la curva de calibración para cada haz de medición, existirá una zona lineal en cada una de ellas. En esta zona las variaciones en la señal están relacionadas linealmente con las fluctuaciones del glóbulo. Una vez conseguida la primera curva de calibración para cada haz, entonces se escoge un voltaje que se encuentre dentro de la zona. El voltaje identificado en la curva de calibración de cada haz debe ser aplicado entonces a su piezoeléctrico asociado. Esto posicionará a cada haz dentro del glóbulo para así comenzar la medición de fluctuaciones de la membrana. La posición de cada haz dentro del glóbulo, conseguida con la aplicación de su respectivo voltaje, asegura la linealidad entre las variaciones de la señal y las fluctuaciones medidas. Junto a lo mencionado anteriormente, la interfaz entrega la posibilidad de seleccionar los puertos de conexión para las cajas controladoras de los fotodetectores y los espejos piezoeléctricos, tal como se muestra en (8). Además, es posible observar en tiempo real las señales de fluctuaciones adquiridas por los fotodetectores, tanto para sus ejes X como para el Y, lo cual es mostrado en (9).

### 4.2.3. Interfaz de control y medición para pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte

La herramienta de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, mostrada en la figura 3.8, fue implementada tanto para su caracterización como también para la evaluación de su posible uso en experimentos de molécula única. Para lo anterior, fueron medidos los principales parámetros que la definen, como por ejemplo, las frecuencias de corte y la rigidez de sus trampas. De esta manera, la implementación de la herramienta considera dos haces para la medición, en donde es necesario tener control sólo sobre uno de ellos. Para esto, fue desarrollada una interfaz de control como la presentada en la figura 4.4. Su desarrollo fue realizado en Labview (National Instruments, NI, USA), y mediante su comunicación con el controlador (Nano drive 85, Mad city Lab Inc.), permite el control de las señales de voltajes aplicadas sobre los ejes X e Y del espejo piezoeléctrico PZM2 (Nano-MTA2HS, Mad City Labs Inc.). Un detalle relevante es que el controlador permite aplicar un rango de voltajes que puede ser dividido en diferentes cantidades de bloques dependiendo de un parámetro de precisión. Como consecuencia, el mismo rango permite cambios entre voltajes con mayor o menor precisión. Es así que se pueden aplicar cambios entre voltajes con una alta precisión debido a que la caja controladora posee una resolución de 20 bits. Además, esta interfaz está comunicada a las cajas controladoras del QPD1 (TPA101, Thorlabs Inc.) y QPD2 (TPA101, Thorlabs Inc.) mediante un conector de bloque I/O (SCC-68, National Instruments, NI, USA) y una tarjeta de adquisición DAQ (PCI 6024E, National Instruments, NI, USA). Esto realiza una conversión A/D de las señales del QPD1 (PDQ80A, Thorlabs Inc.) y QPD2 (PDQ80A, Thorlabs Inc.) permitiendo la adquisición y extracción de datos de las señales de posición de las esferas atrapadas por ambos haces de atrapamiento.

De acuerdo a la figura 4.4, cuando el interruptor de la interfaz se encuentra encendido (ON: Voltaje Automático), el cual es señalado en (1), el programa permite aplicar un barrido de voltaje sobre el espejo piezoeléctrico PZM2 dentro del rango que permite su caja controladora. La aplicación de este barrido puede ser aplicado tanto a su eje X como Y (2). La interfaz, está programada internamente de manera de que el parámetro de precisión de la caja controladora es un parámetro fijo. En particular, este parámetro de precisión fue definido con un valor de 0.001 (sin unidades). Como consecuencia, es posible aplicar 2200 voltajes diferentes sobre PZM2 dentro de un rango fijo de voltajes posibles, o dicho de otro modo, se pueden aplicar 2200 posiciones de voltaje en el rango del barrido. Por lo tanto, el rango del barrido y el paso entre los voltajes aplicados, deben ser definidos en términos de este número y no directamente en voltaje. Tanto el rango de voltajes del barrido como la magnitud del paso, pueden ser ingresados en (3). Lo anterior permite 2200 posiciones diferentes de la trampa asociada a PZM2 en el plano de la muestra. Para el caso automático en particular, tanto el eje del PZM2 al cual se le aplicará el barrido, como el rango y el paso de voltajes del mismo, deben ser definidos antes de pulsar modo automático en (1). Una vez que se pulsa para trabajar en este modo, se comienza a realizar el barrido de voltajes sobre PZM2, y a la vez, la adquisición y grabación de datos. Las características tanto de la tasa de muestreo (Sample Rate), como de la cantidad de muestras adquiri-



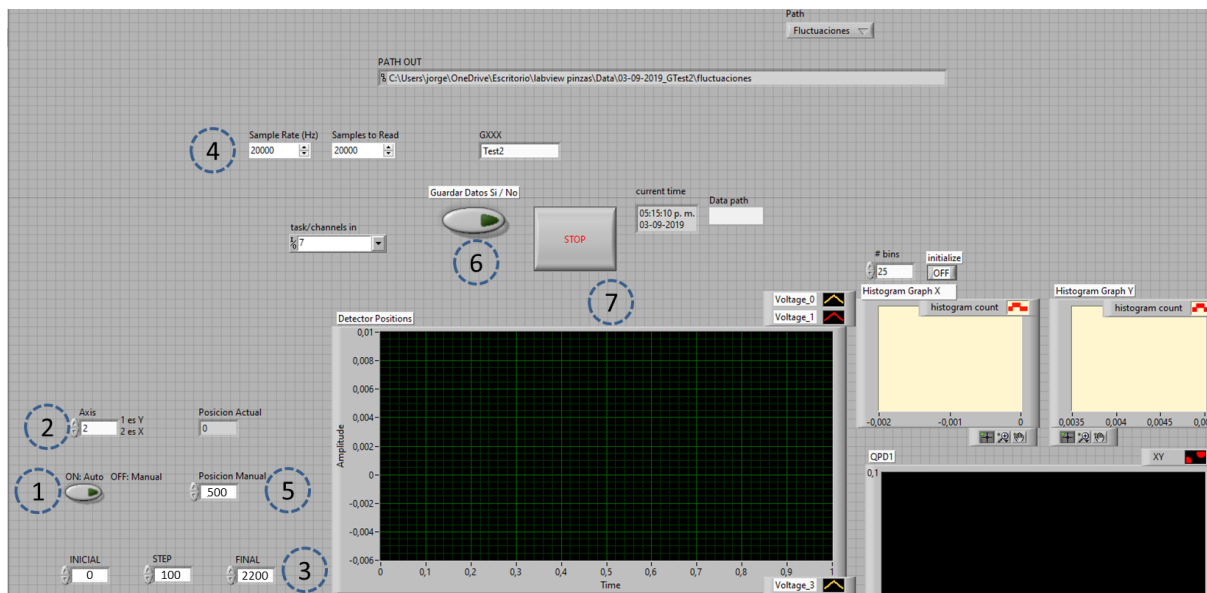


Figura 4.4: Interfaz de control y adquisición de datos para calibración y medición en un sistema de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. Esta es utilizada para su calibración y caracterización. Un modo de funcionamiento en modo automático (1) permite aplicar un barrido de voltaje sobre el espejo piezoeléctrico PZM2 dentro del rango que permite su caja controladora. La aplicación de este barrido puede ser aplicado tanto a su eje X como Y según se escoja (2). El rango del barrido es traducido a una escala de 2200 voltajes posibles y tanto sus límites como la magnitud del paso con que se realiza, pueden ser ingresados en (3). Las características tanto de la tasa de muestreo (Sample Rate), como de la cantidad de muestras adquiridas (Samples to read) en cada paso del barrido de voltajes, pueden ser definidas como en (4). El barrido de voltajes, la adquisición y medición de señales comienza inmediatamente al seleccionar ON para el modo automático. Por lo anterior, previamente debe ser escogido el eje (2), los límites y el paso del barrido (3) y las características de la adquisición y medición (4). El modo automático es utilizado para la caracterización los parámetros de ambas trampas al colocarlas a diferentes distancias y para eventuales estiramientos y aplicaciones de fuerza sobre algún espécimen biológico bajo estudio. En el modo manual de la interfaz (OFF: Voltaje Manual), el cual es señalado en (1), es posible aplicar en (5) un voltaje manual fijo sobre un eje definido del PZM2 escogido en (2). Para comenzar la adquisición y grabación de datos en este modo, previamente se deben definir las características de la adquisición y medición en (4) y pulsar el botón guardar datos mostrado en (6). Además, las señales de los ejes X e Y, de los QPD1 y QPD2, pueden ser vistas en tiempo real, tal como es mostrado en (7). Imagen de Elaboración propia.

das (Samples to read) en cada paso del barrido de voltajes, pueden ser definidas como en (4). Esto define el intervalo de tiempo entre cada paso de voltaje aplicado. El modo automático es utilizado principalmente para la caracterización los parámetros de ambas trampas al colocarlas a diferentes distancias. Además, en un caso experimental real, permite realizar estiramientos y aplicaciones de fuerza sobre el espécimen biológico bajo estudio.

Por otro lado, cuando el interruptor de la interfaz se encuentra apagado (OFF: Voltaje Manual), el cual es señalado en (1), es posible aplicar en (5) un voltaje manual fijo sobre un eje definido del PZM2 escogido en (2). Para comenzar la adquisición y grabación de datos en este modo, previamente se debe definir la tasa de muestreo (Sample Rate) y de la cantidad de muestras adquiridas (Samples to read) en (4) y pulsar el botón guardar datos mostrado en (6). Junto a lo anteriormente mencionado, la interfaz entrega la posibilidad de observar en tiempo real las señales de fluctuación adquiridas por los fotodetectores QPD1 y QPD2, tanto para sus ejes X como para el Y, tal como es mostrado en (7). Como consideración general, un aspecto a considerar dentro de la programación de la interfaz, es que si se cambia el parámetro de precisión programado internamente, el número de pasos en el que se puede dividir el rango de voltajes aumentará.

### 4.3. Calibración del desplazamiento de los haces en el plano de la muestra (Test Target)

Tanto en las implementaciones de TRMFS, como en la de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, los haces de cada uno de estos montajes son desplazados en el plano de la muestra al aplicar voltajes a los espejos que controlan sus posiciones. Desplazamientos  $\geq 2 \mu\text{m}$  son deseados en el plano mencionado para asegurar procedimientos de calibración de señales que permitan transformarlas desde voltaje a nanómetros. De manera de ejemplificar cómo se estima el desplazamiento en micrómetros de los haces en el plano de la muestra, es presentada la figura 4.5. Para conocer estos desplazamientos, es usado un objetivo de prueba (R1DS1N, Test target 1", Thorlabs Inc.) como el mostrado en la figura 4.5A, el cual permite conocer el tamaño del pixel en el plano de la muestra en unidades de longitud real. Por su parte, la figura 4.5B muestra un acercamiento a la estructura central que lo compone. Esta, contiene múltiples familias de líneas calibradas por el fabricante, es decir, tienen una longitud conocida. Si este elemento es colocado en el plano de la muestra de un microscopio, entonces permitirá observar alguna de las familias de las líneas calibradas. En particular La figura 4.5C muestra las líneas del tipo 1 de la familia 7. Estas líneas corresponden a un tamaño de  $3.91 \mu\text{m}$ . Entonces, para la determinación del tamaño de pixel, la imagen del objetivo de prueba es formada al colocarlo en el plano de la muestra del montaje. Típicamente, son observados los elementos del grupo 1 de la familia 7. Logrado esto, se cuenta la cantidad de píxeles que forman transversalmente cualquiera de las líneas del grupo 1. Dado que el tamaño de estas es  $3.91 \mu\text{m}$ , entonces esta cantidad es dividida por el número de píxeles contados y se obtiene el tamaño de pixel en unidades de micrómetros. Conociendo entonces el tamaño de un pixel en micrómetros y el desplazamiento de los haces



dentro de la imagen en cantidad de píxeles, es posible determinar los desplazamientos de los haces en el plano de la muestra en unidades de micrómetros. Los resultados de la determinación del tamaño de pixel y el cálculo del desplazamiento de los haces para cada montaje, son mostrados a continuación de manera separada.

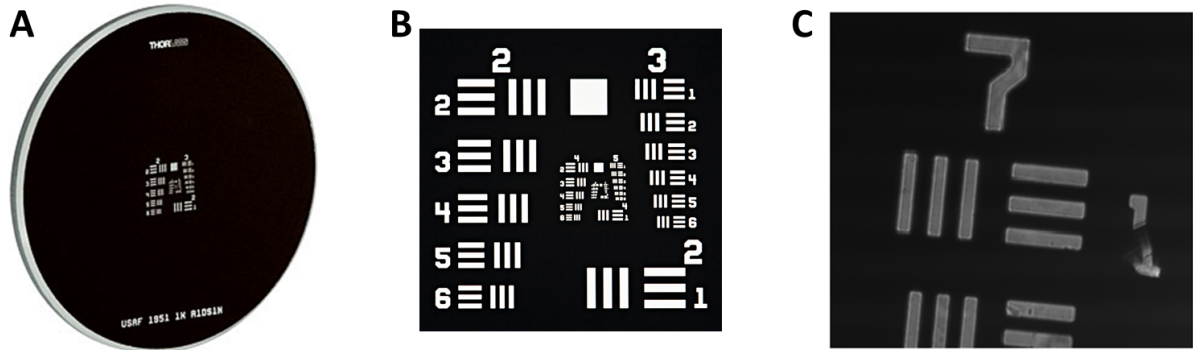


Figura 4.5: Objetivo de prueba (R1DS1N, Test target 1”, Thorlabs Inc.) usado para determinar la equivalencia en medidas de longitud reales de cada pixel observado en el plano de la muestra. **A** Imagen real del objetivo de prueba. **B** Acercamiento a la estructura interna de líneas calibradas para determinación de píxeles. **C** Imagen de grupo 1 de líneas de la familia 7 del objetivo de prueba. Esta familia fue usada en este trabajo para la determinación del tamaño del pixel.

### 4.3.1. Desplazamientos en el plano de la muestra de pinza única en TRMFS

Para el esquema de pinza única en TRMFS, se determinó el desplazamiento de una sola trampa en el plano de la muestra. Para lo anterior, se calculó el desplazamiento total en píxeles al aplicar al PZM del montaje, mostrado en figura 3.6, un voltaje de 0 V y 150 V. El desplazamiento conseguido al aplicar ambos voltajes es mostrado en la figura 4.6, en donde se indica la posición del haz a 0 V y a 150 V. La determinación de la cantidad de píxeles que se mueve el haz entre ambos voltajes y la determinación del tamaño de pixel mediante el uso del objetivo de prueba, permitió calcular que el haz fue capaz de moverse  $2.2 \mu\text{m}$  en el plano de la muestra.

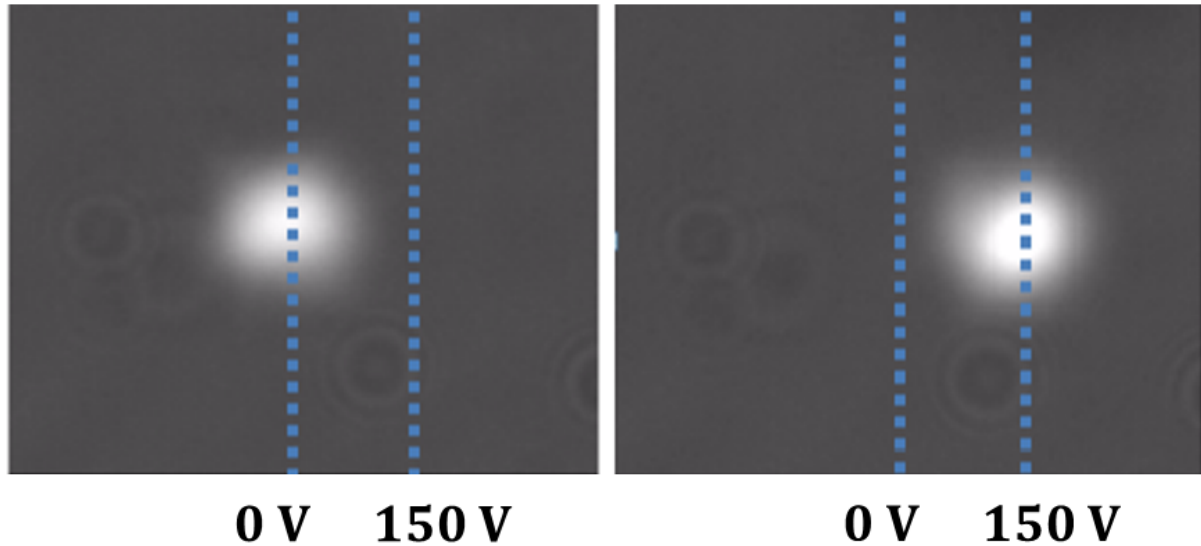


Figura 4.6: Desplazamiento del haz para esquema de TRMFS de haz único al aplicar 0 V y 150 V a PZM de acuerdo a su esquema, mostrado en figura 3.6. La determinación del tamaño de pixel mediante el objetivo de prueba, permitió determinar que este desplazamiento corresponde a  $2.2 \mu\text{m}$ . Imagen de elaboración propia.

#### 4.3.2. Desplazamientos en el plano de la muestra de pinzas dobles en TRMFS

Para el esquema de pinzas dobles de TRMFS, fue necesario determinar el movimiento de los dos haces que lo componen. Una vez determinado el tamaño de pixel en el plano de la muestra, nuevamente fue necesario aplicar un voltaje de 0 V y 150 V a cada haz por separado. Dado el diseño del esquema, ambos haces deben moverse aproximadamente la misma magnitud en el plano de la muestra. El desplazamiento de los haces conseguido en la implementación de TRMFS de doble pinza óptica, es observado en la figura 4.7. En esta, se ha denominado  $S_{|H\rangle}$  al haz de polarización horizontal que se encontrará siempre a la izquierda de cualquier glóbulo a medir, y  $S_{|V\rangle}$ , al de polarización vertical a la derecha. Las figuras 4.7A y 4.7B, muestran la posición de  $S_{|H\rangle}$  cuando es aplicado 0 V y 150 V sobre el espejo piezoeléctrico PZM1, y las figuras 4.7C Y 4.7D muestran cuando estos mismos voltajes son aplicados a PZM2. Ambos piezoeléctricos son descritos en el montaje de la técnica mostrado en la figura 3.7.

Para un cálculo más preciso de los desplazamientos observados en estas imágenes, se generaron los perfiles de movimiento de los haces, tanto para el caso de  $S_{|H\rangle}$  como para  $S_{|V\rangle}$ , tal como se muestra en 4.8, la cual indica el desplazamiento de los perfiles de  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  en pixeles y en  $\mu\text{m}$  al aplicar voltajes de 0 V y 150 V a los piezoeléctricos que controlan sus posiciones en el plano de la muestra. En particular, la figura 4.8A, muestra las posiciones del perfil del haz  $S_{|H\rangle}$  cuando se le aplica a PZM1 un voltaje de 0 V y 150 V. La diferencia

en pixeles entre ambas posiciones es 31 pixeles. Considerando que el tamaño de pixel calculado para TRMFS de dos pinzas fue de 75.1 nm, entonces el desplazamiento total de  $S_{|H\rangle}$  es de 2.3281  $\mu\text{m}$ . Lo anterior fue repetido para  $S_{|V\rangle}$ , tal como se muestra en 4.8B. Para este caso, al aplicar voltajes de 0 V y 150 V a PZM2, el desplazamiento del haz en pixeles fue de 27 pixeles, y dado el tamaño de pixel antes mencionado, su desplazamiento total fue de 2.0277  $\mu\text{m}$ . La diferencia de desplazamientos entre ambos haces puede deberse a pequeñas diferencias en las posiciones de los espejos PZM1 y PZM2 respecto al plano focal trasero de OL1 (ver figura 3.7). Sin embargo, los desplazamientos alcanzados son los deseados.

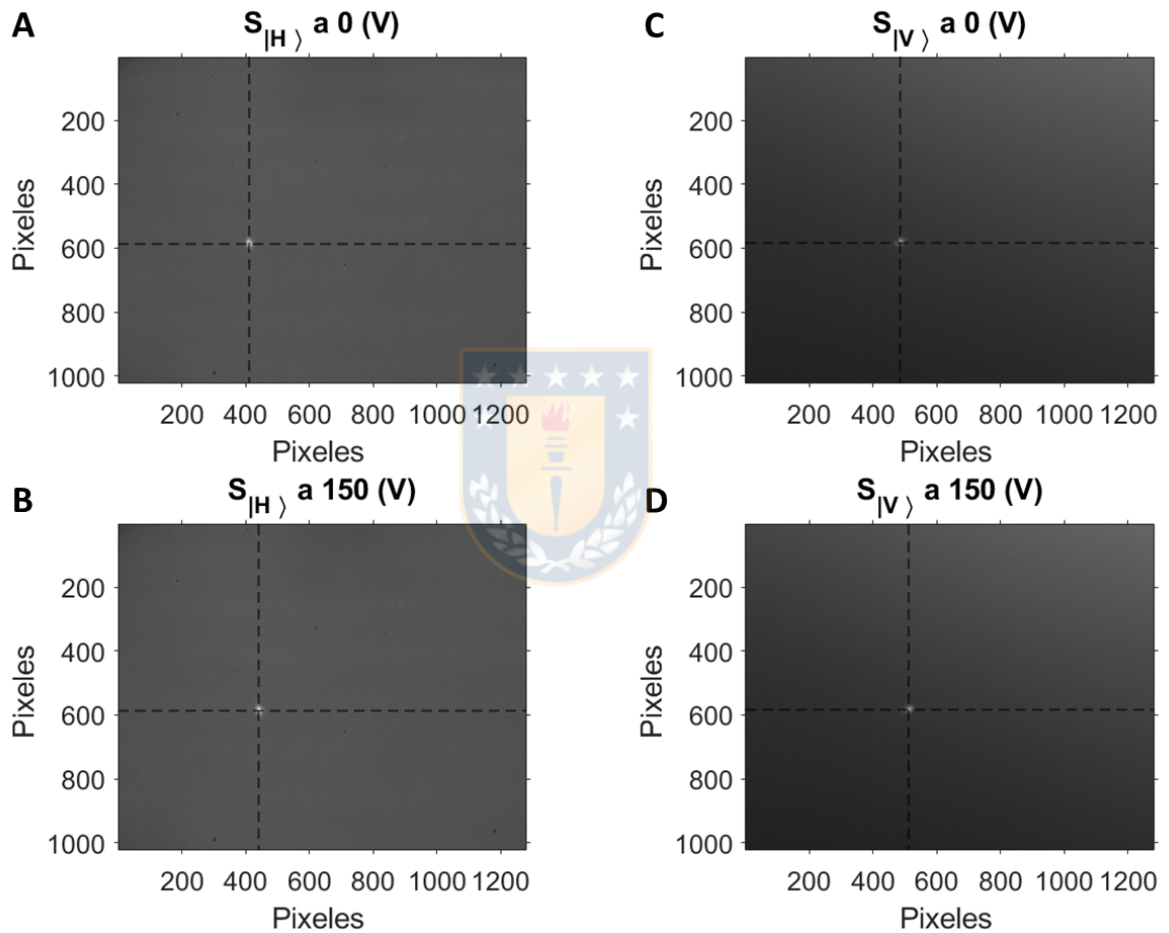


Figura 4.7: Desplazamientos en el plano de la muestra de los haces en la implementación de TRMFS de doble pinza óptica al aplicar 0 V y 150 V a los espejos piezoeléctricos que los controlan en forma independiente. Para facilitar la descripción de los dos haces, se ha denominado  $S_{|H\rangle}$  al haz de polarización horizontal que se encontrará siempre a la izquierda de cualquier glóbulo a medir, y  $S_{|V\rangle}$ , al de polarización vertical a la derecha.  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  son controlados por los espejos piezoeléctricos PZM1 y PZM2, respectivamente (ver figura 3.7). Imagen de elaboración propia.

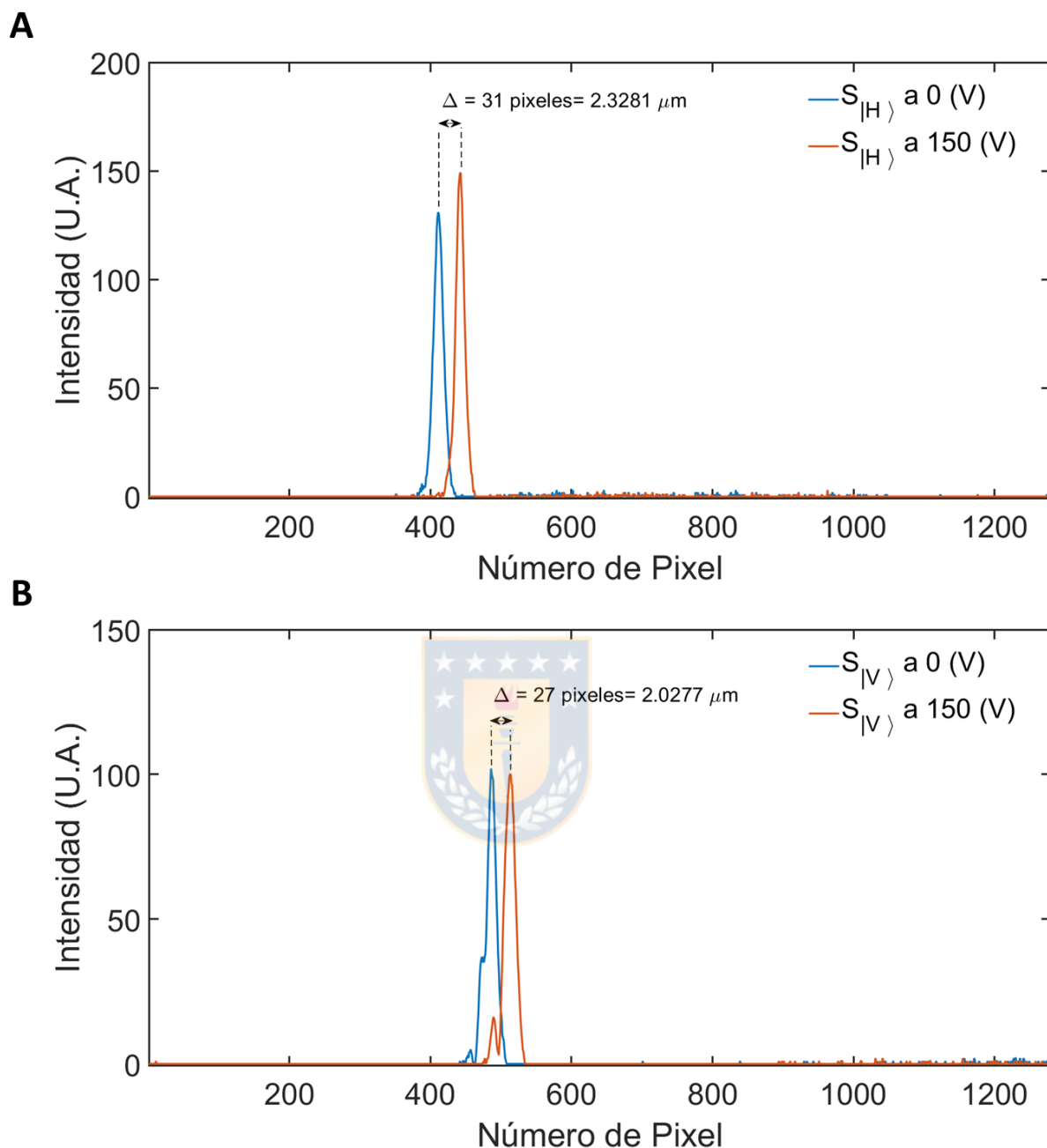


Figura 4.8: Desplazamiento de los perfiles de  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  en pixeles y en  $\mu\text{m}$  al aplicar voltajes de 0 V y 150 V a los piezoeléctricos que controlan sus posiciones en el plano de la muestra. **A** Desplazamiento entre voltajes para el perfil del haz indicado como  $S_{|H\rangle}$ , el cual corresponde al haz de polarización horizontal sobre la izquierda de cualquier glóbulo rojo a medir mediante la técnica de TRMFS de doble haz. **B** Desplazamiento entre voltajes para el perfil del haz indicado como  $S_{|V\rangle}$ . Este haz será el haz de polarización vertical sobre la derecha de cualquier glóbulo rojo en las mediciones realizadas con esta técnica. Imagen de elaboración propia.

### 4.3.3. Desplazamientos en el plano de la muestra de pinzas dobles en régimen de atrapamiento fuerte

En el caso particular de las pinzas ópticas de atrapamiento fuerte, si bien ambos espejos piezoeléctricos dentro del montaje pueden producir desplazamientos de los haces en el plano de la muestra, tal como se indica en la figura 3.8, sólo es necesario determinar el desplazamiento total producido por uno de ellos. Esto se debe a que, típicamente, la estrategia de medición implica simular que uno de los extremos del espécimen biológico estudiado está adherido a alguna superficie. Lo anterior, se traduce en que una de las pinzas se encontrará en posición estática, mientras que la misma, mantiene atrapada una esfera funcionalizada a uno de los extremos del espécimen estudiado. Esta función es realizada por la trampa  $S_{|H\rangle}$  de polarización horizontal, la cual, para el montaje de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, se ha posicionada de manera arbitraria, a la derecha de la trampa  $S_{|V\rangle}$  de polarización vertical, a diferencia del montaje de TRMFS de doble haz. Por su parte, la trampa  $S_{|V\rangle}$ , ubicada mecánicamente a la izquierda de  $S_{|H\rangle}$ , tiene la capacidad de moverse un amplio rango en micrómetros, lo que permite que, potencialmente, pueda ejercer fuerzas controladas y estiramientos sobre algún espécimen bajo estudio. Se determinó entonces la linealidad del movimiento y el desplazamiento total de  $S_{|V\rangle}$  bajo condiciones de control, calculando previamente un tamaño de pixel de 72.2096 nm en la imagen del plano de la muestra. Esto, es mostrado en la figura 4.9, en la cual se muestra la caracterización del desplazamiento de  $S_{|V\rangle}$  al aplicar a su espejo de control PZM2, diferentes voltajes mediante el uso de una interfaz de Labview que maneja su caja de control. Este control fue utilizado en una configuración tal que permitió aplicar voltajes a PZM2 equivalentes a 2200 pasos máximos de la trampa dentro del plano de la muestra. Las figuras 4.9A y 4.9B muestran el desplazamiento de  $S_{|V\rangle}$  cuando no ha sido desplazado y cuando se han aplicado 2200 pasos para su movimiento, respectivamente. Lo anterior, permitió determinar que 2200 pasos corresponden a 174 píxeles de movimiento en la imagen equivalentes a  $12.5645 \mu\text{m}$ . A la vez, esto permitió definir que cada paso corresponde a un movimiento de 5.7111 nm. Por su parte, la figura 4.9C muestra la linealidad del desplazamiento del haz al aplicar desplazamientos de 200 pasos, generando 11 posiciones diferentes del haz entre 0 y 2200. Cada cambio de posición de 200 pasos entonces corresponde a desplazamientos de  $1.1422 \mu\text{m}$ . Es importante hacer notar que, bajo la configuración usada, fue posible generar 2200 posiciones diferentes del haz dentro del plano de la muestra. Sin embargo, esta cantidad de pasos puede ser aumentada pues existe un parámetro que puede ser variado en el sistema de control, la denominada precisión. Para esta configuración, fue utilizada una precisión de 0.001, número sin unidades que define el mínimo paso exigido a la caja de control del PZM2. Si se le exige un número más pequeño mediante la interfaz de Labview, entonces pasos más pequeños que 5.7111 nm pueden ser generados en el plano de la trampa. De este modo, la cantidad de pasos entre el máximo y mínimo voltaje aplicado a PZM2 aumentará. Lo anterior es posible dado que la caja de control de PZM2 tiene la capacidad de generar un rango dinámico de 20 bits. Pasos menores aquí no fueron utilizados dado que no aportan en el análisis realizado, y que pasos muy pequeños, no pueden ser distinguibles. Finalmente, es necesario tener en consideración que los valores de desplazamientos y tamaños de pixel presentados en unidades de longitud, son estimaciones (cálculos) en

base a procedimientos experimentales, y es la razón por la cual, son presentados con un número importante de cifras significativas de manera arbitraria.

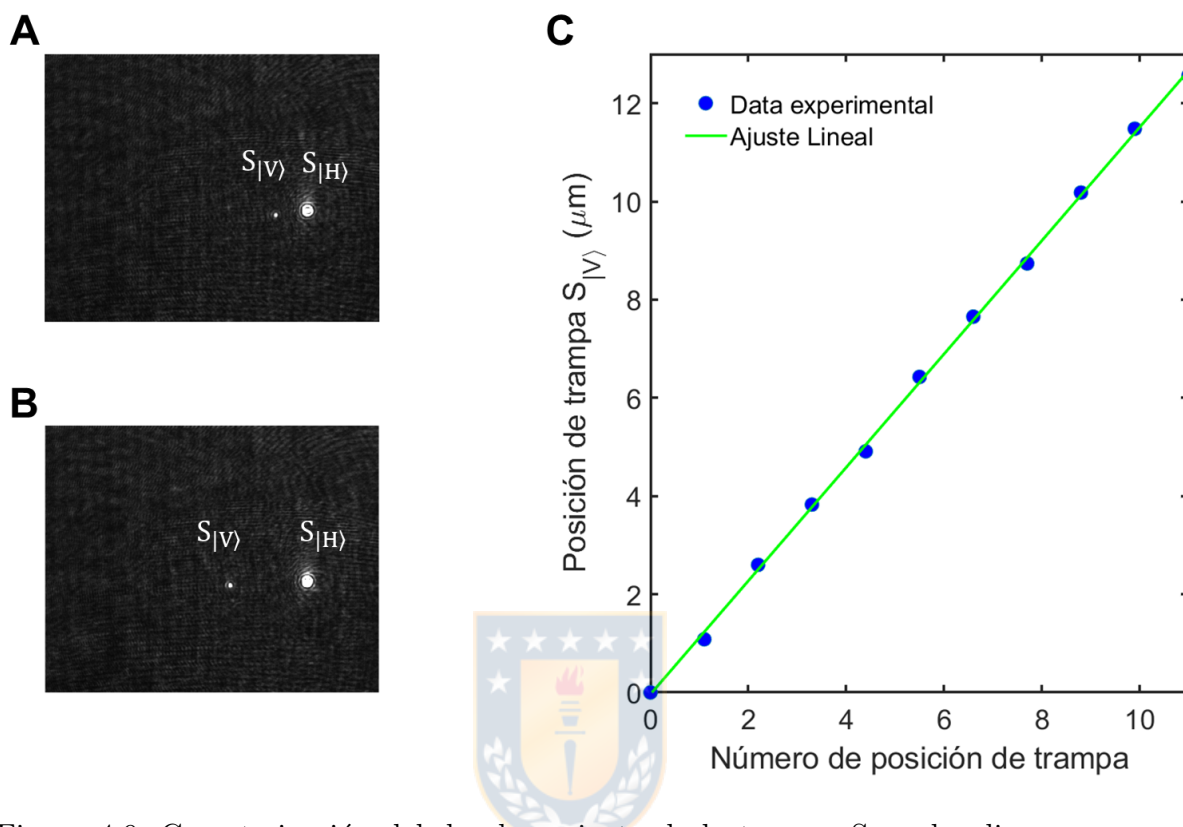


Figura 4.9: Caracterización del desplazamiento de la trampa  $S_{|V\rangle}$  al aplicar a su espejo de control PZM2 diferentes voltajes mediante un sistema de control. Esta trampa es la responsable de ejercer fuerzas y estiramientos controlados sobre el espécimen de estudio. **A** Posición de  $S_{|V\rangle}$  cuando ningún voltaje es aplicado sobre PZM2. **B** Posición de  $S_{|V\rangle}$  cuando un voltaje máximo es aplicado a PZM2. Este desplazamiento en pixeles corresponde a 2200 pasos entre las posiciones de **A** y **B** y es equivalente a un desplazamiento real de  $12.5645 \mu\text{m}$  con pasos de  $5.7111 \text{ nm}$ . **C** Posiciones de  $S_{|V\rangle}$  al generar 11 posiciones espaciadas por 200 cada una. Esto, da cuenta de la linealidad del movimiento de la trampa. Imagen de elaboración propia.

#### 4.4. Protocolos de preparación de muestras biológicas y objetos de atrapamiento

Los montajes realizados en este trabajo, asociados a TRMFS de pinza única, TRMFS de pinza doble y pinzas dobles de atrapamiento fuerte, tuvieron contextos de medición diferentes. Es así que, TRMFS de pinza única, estuvo enfocada en estudiar los efectos protectores del resveratrol sobre los glóbulos rojos para lo cual, se midieron las fluctua-



ciones y parámetros mecánicos de la membrana. Por su parte, TRMFS de doble pinza estuvo enfocada en estudiar los efectos de la glucosa en glóbulos rojos para lo cual se midieron fluctuaciones de membrana y parámetros mecánicos, pero esta vez, para dos haces simétricamente separados. El tipo de glucosa considerada para este estudio fue en particular la D-glucosa. Finalmente, las pinzas ópticas de atrapamiento fuerte fueron implementadas de manera de poder caracterizarlas y evaluar su futuro uso en aplicaciones biológicas complejas, tales como, el estudio de moléculas únicas. Para cada uno de estos tres casos fue necesario preparar las muestras biológicas en el laboratorio, en donde se establecieron metodologías para su preparación. Los detalles de estos procedimientos son descritos a continuación para cada uno de los casos.

#### 4.4.1. Muestras de glóbulos rojos en TRMFS de pinza única: Efectos protectores del resveratrol en glóbulos rojos

Glóbulos rojos de un donante voluntario sano y no expuesto a tratamiento farmacológico fueron usados para el estudio de los efectos protectores del resveratrol en la sangre. Para lo anterior, los glóbulos rojos fueron expuesto a cuatro diferentes condiciones. La primera fue la condición control, es decir, glóbulos rojos en una solución que trata de asemejar sus condiciones naturales en la sangre. La segunda, fue glóbulos rojos expuestos a una concentración de 0.2 mM de ácido hipocloroso (HClO), suficiente para causar efectos controlados sobre el glóbulo sin que pierda su forma y estructura de glóbulo sano. La tercera, es una condición en donde los glóbulos rojos son incubados por un periodo de 1 hora en 20  $\mu$ M de resveratrol (RV), concentración suficiente para que no existan cambios observables en la forma de los glóbulos rojos. Por último, la cuarta condición fue realizada para confirmar directamente los posibles efectos protectores del resveratrol sobre los glóbulos. Esta consistió en incubar glóbulos rojos por 1 hora en 20  $\mu$ M de RV, en donde luego de ese tiempo, se le sumó una concentración de 0.2 mM de HClO. Para estudiar cada condición, una cámara sellada consistente de dos cubreobjetos fue fabricada para contener cada una de las soluciones de glóbulos rojos, en donde fueron usados dos cubreobjetos (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG) de 24x50 mm<sup>2</sup> (arriba y abajo). Un esquema de la fabricación de esta cámara puede ser observada en la figura 4.10, en donde se detallan las secuencias de fabricación. La figura 4.10A muestra los dos cubreobjetos utilizados en la fabricación de la cámara, en donde a uno de ellos, se le deposita un papel Parafilm (plástico) cortado en forma de U para la posterior unión entre ambos. La forma de U permite crear luego un canal de flujo para la solución ingresada en la cámara. La figura 4.10B muestra la unión entre ambas cámaras al ponerlas en contacto y aplicar calor mediante una plancha de calor. Lo anterior, favorece que el papel Parafilm se derrita, sellando los costados de la cámara y dejando abierta su parte superior. Finalmente, la figura 4.10C muestra el estado final de fabricación de la cámara. Luego de ingresar la solución a la cámara por la parte superior abierta de la cámara, esta es sellada al colocar papel Parafilm en la parte superior de los canales. Considerando la descripción anteriormente realizada, un resumen de los protocolos de la preparación de las diferentes condiciones es descrita abajo.



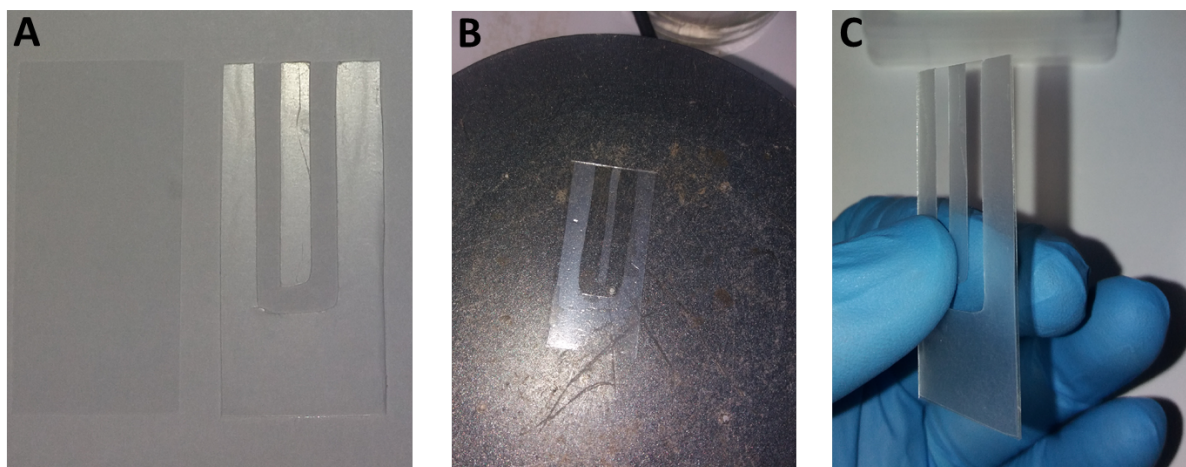


Figura 4.10: Construcción de una cámara para contener solución de glóbulos rojos incubados en resveratrol y otras soluciones para TRMFS de haz único. **A** Muestra de los dos cubreobjetos utilizados en la fabricación de la cámara. Uno de ellos tiene depositado un papel Parafilm cortado en forma de U para la posterior adhesión entre ambos cubreobjetos. Esta forma, permite que la cámara final tenga un canal para el flujo de la solución a estudiar en la cámara. **B** Ambos cubreobjetos son unidos al utilizar un papel Parafilm entre ellos. Al aplicar calor, el papel Parafilm entre ellos se derrite de manera que ambos cubreobjetos quedan unidos. **C** Cámara conseguida luego del sellado por medio de la aplicación de calor. Imagen de elaboración propia.

### Glóbulos rojos normales: muestra Control

Para estudiar la condición de control, dos tubos Eppendorf fueron utilizados, etiquetados como tubo Eppendorf 1 y tubo Eppendorf 2. En el tubo Eppendorf 1 una cantidad de  $10 \mu\text{L}$  de sangre, extraída de un paciente sano, fueron diluidos en 1 mL de PBS 1X mezclado con 0.4 grs. de BSA (bovine serum albumin). Una cantidad de  $50 \mu\text{L}$  son extraídas desde el tubo Eppendorf 1 y colocados en tubo Eppendorf 2 que contiene 1 mL de PBS 1X mezclado con 0.4 grs. de BSA (bovine serum albumin). Este tubo contiene la concentración apropiada de glóbulos rojos. Un volumen desde este tubo es entonces incorporado a una cámara, en donde inmediatamente se verifica que todos los glóbulos dentro de ella se encuentran sanos para su estudio. Verificado lo anterior, la muestra se deja decantar dentro de la cámara durante al menos 10 minutos de manera que los glóbulos se adhieran a uno de los cubre objetos.

### Glóbulos rojos con ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ )

Para estudiar el efecto del ácido hipocloroso sobre las propiedades de los glóbulos rojos, estos son expuestos a una concentración en donde no se produzcan cambios de forma evidentes. Los glóbulos rojos fueron entonces expuestos a una concentración de 0.2 mM de

HClO. Para esto, Nuevamente dos tubos Eppendorf fueron utilizados, un tubo Eppendorf 1 y un tubo Eppendorf 2. Al igual que en la muestra del control, en el tubo Eppendorf 1 una cantidad de 10  $\mu\text{L}$  de sangre, extraída de un paciente sano, fueron diluidos en 1 mL de PBS 1X mezclado con 0.4 grs. de BSA. Una cantidad de 50  $\mu\text{L}$  son extraídas desde el tubo Eppendorf 1 y colocados en tubo Eppendorf 2 que contiene 1 mL de PBS 1X mezclado con 0.4 grs. de BSA (bovine serum albumin). Desde este tubo tubo Eppendorf 2, se extrajeron 56  $\mu\text{L}$  y se incorporó en este un volumen de 6  $\mu\text{L}$  de HClO extraído desde una solución de HClO a una concentración de 34 mM. Esto corresponde a generar en el tubo Eppendorf 2 una muestra de glóbulos expuestos a una concentración de 0.2 mM de HClO como es deseado. Un cierto volumen de esta solución es insertado dentro de la cámara, verificando en el microscopio que lo glóbulos se encuentran sanos, es decir, que no se hayan producido cambios de forma. Luego, la muestra es dejada decantar por al menos 10 minutos con el fin de que los glóbulos se adhieran a la superficie.

### Glóbulos rojos con resveratrol

Los efectos directos del resveratrol sobre las propiedades de los glóbulos rojos también fueron estudiados. Los glóbulos rojos fueron expuestos a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de RV, la cual se verificó, no produce cambios de forma y estructura en los objetos de estudio. Para lograr esto, tal como en los casos anteriores, dos tubos Eppendorf fueron utilizados, un tubo Eppendorf 1 y un tubo Eppendorf 2. En el tubo Eppendorf 1 una cantidad de 10  $\mu\text{L}$  de sangre, extraída de un paciente sano, fue diluida en 1 mL de PBS 1X mezclado con 0.4 grs. de BSA. Una cantidad de 50  $\mu\text{L}$  fue extraída desde el tubo Eppendorf 1 y colocada en el tubo Eppendorf 2 que contiene 1 mL de PBS 1X mezclado con 0.4 grs. de BSA. Desde el tubo Eppendorf 2, se extrajeron 232  $\mu\text{L}$  y se incorporaron en este mismo tubo 182  $\mu\text{L}$  de RV desde 0.25 mL de resveratrol. Se dejó entonces incubar durante 1 hora. Luego de este tiempo, se introdujo un cierto volumen de esta solución dentro de la cámara y se verificó en el microscopio que lo glóbulos se encontraban sanos. Luego, la muestra se dejó decantar por al menos 10 minutos con el fin de que los glóbulos se adhirieran a la superficie.

### Glóbulos rojos con resveratrol y ácido hipocloroso

La última condición a estudiar, es qué sucede cuando los glóbulos rojos son previamente incubados con resveratrol y luego expuestos a ácido hipocloroso. En este caso, es necesario repetir el procedimiento previamente descrito de incubación de glóbulos rojos en RV durante 1 hora. Luego de ese tiempo, se deben colocar en el tubo Eppendorf 2 una cantidad de 6  $\mu\text{L}$  de HClO extraído desde una solución de HClO a una concentración de 34 mM. Un volumen desde el tubo Eppendorf 2 es entonces incorporado a la cámara fabricada para la muestra, verificando en el microscopio, que los glóbulos no hayan sufrido cambios apreciables de su estructura, es decir, que se encuentran sanos. Antes de realizar la medición, se dejó decantar la muestra durante al menos 10 minutos para la adhesión de los glóbulos a la superficie de uno de los cubreobjetos que conforman la cámara.

#### 4.4.2. Muestras en TRMFS de pinzas dobles: Efectos de la glucosa en glóbulos rojos

Glóbulos rojos de un donante voluntario sano, y no expuesto a tratamiento farmacológico, fueron usados para el estudio de los efectos de la glucosa sobre ellos. Los glóbulos rojos fueron incubados durante 24 horas a 36 °C en tres diferentes concentraciones de D-glucosa, 5.5 mM, 12.5 mM y 25 mM. Esto se hizo para observar los efectos sobre las propiedades de los glóbulos rojos, como las amplitudes de fluctuación (STD), el módulo de flexión ( $\kappa$ ) y la tensión ( $\sigma$ ). En este contexto, es fundamental mencionar que una baja concentración de D-glucosa, es decir 5.5 mM, es típica en pacientes saludables y es considerada como control. Para estudiar cada concentración, una cámara sellada consistente de dos cubreobjetos fue fabricada para contener la solución de glóbulos rojos incubada, en donde fueron usados cubreobjetos de 18x18 mm<sup>2</sup> (arriba) y 24x50 mm<sup>2</sup> (abajo) (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG).

Un esquema de la cámara fabricada para contener la solución con los glóbulos incubados puede ser observada en la figura 4.11, en donde se detallan los pasos de su construcción. La figura 4.11A muestra como dos cubreobjetos deben ser unidos mediante una cinta doble faz. Por su parte, la figura 4.11B muestra cómo se observan los cubreobjetos ya unidos y cómo es insertada la solución incubada dentro de la cámara. Finalmente, la figura 4.11C muestra la cámara sellada con la solución en su interior en donde dos de sus bordes han sido sellados con una sustancia acrílica.

Considerando la descripción anteriormente realizada, un resumen del protocolo de preparación de muestras es el siguiente. Se usaron tubos Eppendorf, etiquetados como 1 y 2, respectivamente. El primero fue para preparar una solución de sangre con alta concentración de glóbulos rojos sanos. Este fue preparado al mezclar 990  $\mu$ L de PBS 1X y 10  $\mu$ L de sangre dentro del Eppendorf 1. Un segundo tubo, etiquetado como Eppendorf 2, fue usado para incubar la sangre a la concentración deseada. Dentro de este tubo Eppendorf 2 fueron colocados volúmenes de PBS y D-glucosa de acuerdo a la concentración a utilizar para la incubación. Para 5.5 mM, fueron mezclados 950  $\mu$ L de PBS 1X con 5  $\mu$ L de D-glucosa y 50  $\mu$ L de sangre extraídos desde el tubo Eppendorf 1. Para 12.5 mM, fueron mezclados 937.5  $\mu$ L de PBS 1X con 12.5  $\mu$ L de D-glucosa y 50  $\mu$ L de sangre extraídos también desde el tubo Eppendorf 1. Finalmente, para 25 mM, se mezclaron 925  $\mu$ L de PBS 1X con 25  $\mu$ L de D-glucosa y también 50  $\mu$ L de sangre extraídos del tubo Eppendorf 1. Para cada caso, la muestra incubada fue puesta en la cámara fabricada como ya ha sido mencionado y, antes de la medición, fue dejada decantar al menos 30 minutos con el fin de que los glóbulos se adhirieran al cubreobjeto de abajo de la cámara.

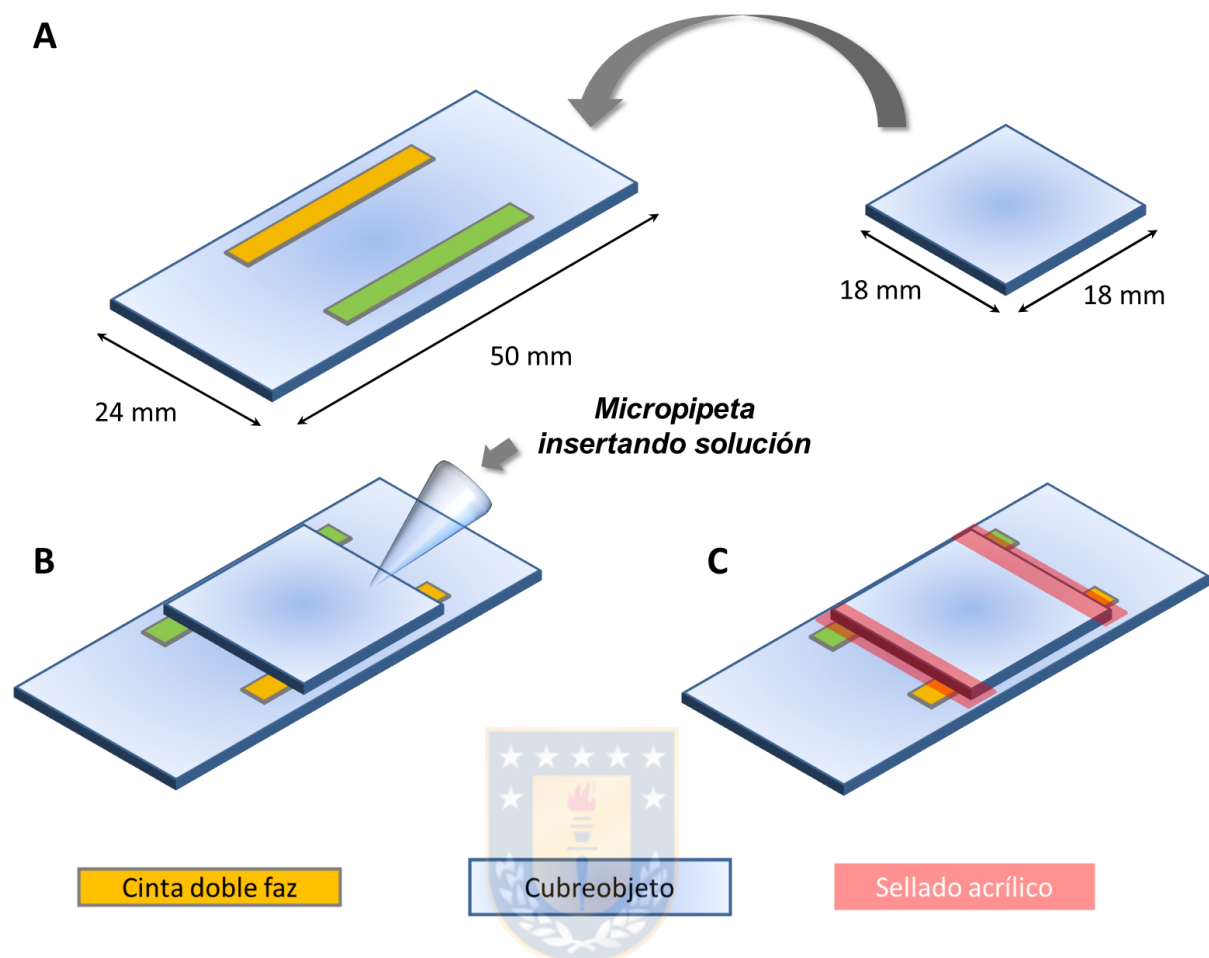


Figura 4.11: Construcción de una cámara para contener solución de glóbulos rojos incubados en D-glucosa para TRMFS de doble haz. **A** Dos cubreobjetos son unidos al colocar cinta doble faz en uno de ellos. **B** Ambos cubreobjetos ya pegados permiten la inserción dentro de la cámara de la solución incubada mediante una micropipeta. **C** Vista de la cámara sellada completamente conteniendo la solución incubada. Para el sellado final, es necesario sellar dos de sus bordes con sustancias acrílicas. Imagen de elaboración propia.

#### 4.4.3. Muestras de esferas de poliestireno en pinzas ópticas dobles en régimen de atrapamiento fuerte

Para pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, se han realizado muestras con el objetivo de caracterizar las fuerzas de atrapamiento de este instrumento sobre esferas de poliestireno. De esta manera, los principales parámetros de esta herramienta pueden ser caracterizados mediante la PSD de la posición de las esferas atrapadas, entre los cuales se encuentran la frecuencias de corte  $f_c$  de sus trampas y sus constantes de difusión de Einstein  $D$ , entre otros. Además, los factores de conversión de volt a nanómetros para cada una de las señales de las trampas y sus constantes de rigidez  $\bar{\kappa}$ , pueden ser obtenidos usando esta misma información. Para realizar esta caracterización, es posible utilizar la

cámara decrita en la figura 4.11, la cual permite contener la muestra con las esferas de poliestireno a atrapar. La preparación de una muestra con esferas a atrapar puede ser descrita de manera simple. Considere dos tubos Eppendorf, etiquetados como tubo Eppendorf 1 y tubo Eppendorf 2. En el tubo Eppendorf 1, se debe colocar 1 mL de agua bi-distilada previamente filtrada con un filtro de  $0.2 \mu\text{m}$ . Desde un concentrado de esferas de poliestrieno de  $2 \mu\text{m}$  de diámetro, se deben extraer  $2 \mu\text{L}$  y colocarlos en el tubo Eppendorf 1. De la solución conseguida en este tubo, se extraen  $50 \mu\text{L}$  y se colocan en un tubo Eppendorf 2 con 1 mL de agua bi-distilada previamente filtrada con un filtro de  $0.2 \mu\text{m}$ . Este tubo contendrá entonces la concentración suficiente de esferas para trabajar de manera óptima al momento del atrapamiento.

## 4.5. Determinación de planos conjugados para fotodetectores de posición de cuatro cuadrantes QPD

Un aspecto relevante al momento de realizar los montajes descritos en las secciones 3.2, 3.3 y 3.4, es la determinación de los planos conjugados del plano focal trasero del lente colimador de cada montaje. En estos planos, ya sea para montajes de un haz o doble haz, es en donde se deben colocar los fotosensores de posición QPDs. Estos planos, además de estar conjugados con el plano focal trasero de OL2, también lo están con el de OL1 y con sus respectivos espejos piezoeléctricos. La determinación de estos planos para los QPDs permiten la implementación de las técnicas de medición de TRMFS y de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, las cuales, están basadas en los mismos principios de la interferometría de plano focal trasero BFPI. En esta sección, se ha querido ejemplificar cómo observar cuando un sensor QPD está posicionado correctamente en el plano conjugado del plano focal trasero de OL2. Para esto, se presenta la figura 4.12, la cual muestra la señal del QPD en el montaje de TRMFS de un sólo haz para cuatro diferentes posiciones a las cuales ha sido colocado en el montaje mostrado en la figura 3.6. Esto permite ejemplificar de manera general el procedimiento para encontrar el plano conjugado del plano focal trasero de OL2 en los tres diferentes montajes experimentales presentados en este trabajo. En particular, una señal periódica de voltaje entre 0 V y 150 V es aplicada sobre el PZM del montaje de la figura 3.6. A medida que esto ocurre, se deben realizar desplazamientos del QPD respecto al lente L5, responsable de formar el plano conjugado del plano focal trasero de OL2. Así, la figura 4.12 muestra cuatro distancias del QPD a L5, desde la posición 1 a la posición 4, en donde en esta última, las oscilaciones del PZM que permiten hacer oscilar el haz en el plano de la muestra, ya no son observables. Cuando esto ocurre, en la posición 4, el fotodetector QPD esta correctamente posicionado en el plano conjugado del plano focal trasero de OL2. La consecuencia de lo anterior, será que las mediciones se hacen insensibles a desplazamiento del haz en el plano de la muestra.



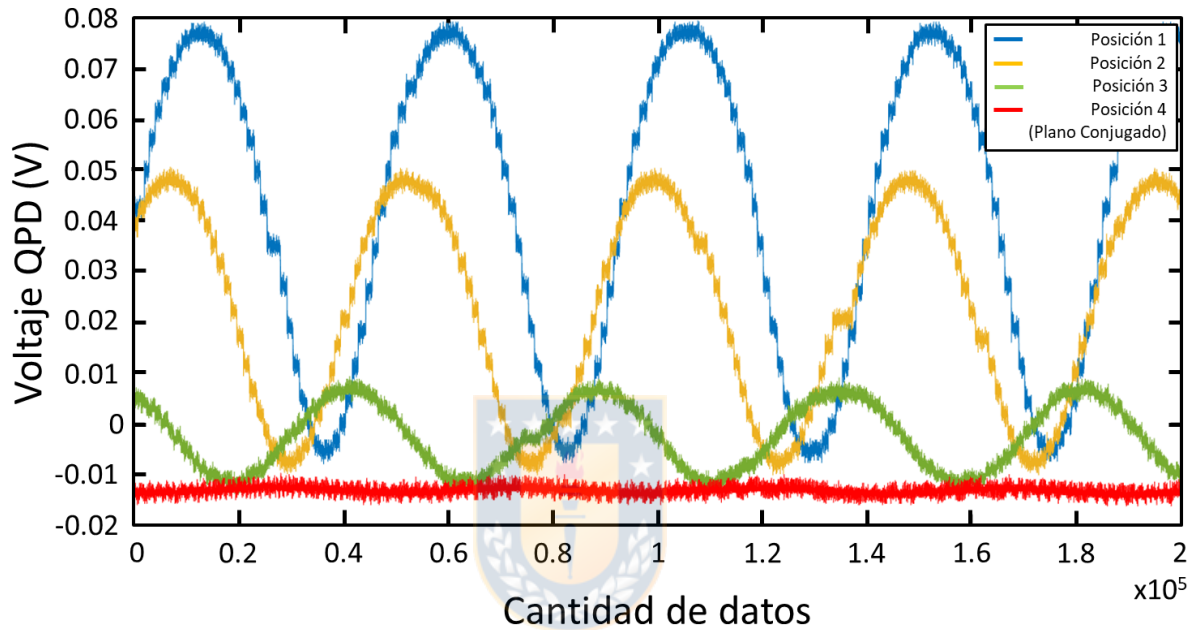


Figura 4.12: Determinación general del plano conjugado del plano focal trasero de OL2 ejemplificado mediante la consideración del montaje de TRMFS de haz único de la figura 3.6. El gráfico muestra las señales adquiridas en el QPD en cuatro diferentes posiciones respecto al lente que forma el plano conjugado del plano focal trasero de OL2 (lente colimador). Desplazamientos progresivos del QPD se realizan, desde la posición 1 a la posición 4, hasta que las oscilaciones aplicadas al PZM ya no son observables, como se aprecia en la posición 4. En esta última posición, el QPD se encuentra en el plano conjugado del plano focal trasero de OL2, el que a su vez, es un plano conjugado del plano focal trasero de OL1 y del mismo PZM. Imagen de elaboración propia.

## 4.6. Experimentos basados en TRMFS: Curvas de calibración y medición

Previo a describir en detalle los casos experimentales de TRMFS de haz único y doble, es pertinente realizar una breve descripción acerca del concepto de calibración, común a ambas implementaciones. En estas, se utilizan fotodetectores QPD. Estos entregan señales de voltaje que varían en función del desplazamiento de los haces que inciden sobre ellos. En particular para montajes de TRMFS, las variaciones de la luz incidente sobre estos detectores se debe a cambios en la distribución de un patrón de interferencia. En el contexto de los estudios tratados en este trabajo, este se produce por la dispersión parcial de un haz enfocado de baja potencia al ser puesto sobre la membrana fluctuante de un glóbulo rojo. La luz dispersada y la no dispersada, es colectada por un lente objetivo, formándose en su plano focal trasero, un patrón de interferencia dinámico debido a la interacción de la luz. Así, un plano conjugado del plano focal trasero del lente colector, en donde se forma este patrón de interferencia dinámico, es generado para posicionar en ese lugar un fotodetector QPD. Este detector, como ya se ha dicho, dará cuenta de las fluctuaciones de la membrana en base a los cambios dinámicos de la distribución del patrón de interferencia. Los principios en los que se basa este tipo de medición, están asociado a la técnica BFPI, la cual ya ha sido descrita en 3.1.3. Así, la señal del detector QPD es entregada en voltaje y debe ser traducida a unidades de longitud, típicamente a nanómetros. Para lo anterior, es necesaria la obtención de la llamada curva de calibración que permite obtener un factor de conversión  $F_C$  de voltaje a nanómetros para las señales de fluctuación medidas. Esta curva se obtiene al desplazar el haz de interés desde afuera hacia adentro del glóbulo rojo. Para esto, se debe aplicar un barrido de voltajes al espejo piezoeléctrico PZM que controla la posición del haz en el plano de la muestra. Este barrido debe ser realizado aplicando pasos de voltaje definidos. El desplazamiento producido por este barrido puede ser calculado en unidades de longitud mediante el procedimiento presentado en la sección 4.3. Esto permite convertir el rango de voltajes aplicado al PZM en un rango de desplazamiento en micrómetros. La realización de lo anterior, generará una señal en el QPD que mostrará tres zonas identificables. En la primera, existe una respuesta plana de la señal del QPD cuando el haz se mueve fuera del glóbulo. En una segunda zona, la respuesta de la señal del QPD será lineal con respecto a la posición del haz dentro del glóbulo. A esta zona se le llama zona lineal de medición. Finalmente, en una tercera zona, la respuesta de la señal del QPD será no lineal con respecto a la posición del haz dentro del glóbulo. Una curva de calibración conceptual, que representa a las obtenidas tanto en TRMFS de haz único como en doble, es mostrada en la figura 4.13. Su obtención es realizada al aplicar un barrido de voltajes con pasos regulares a un espejo piezoeléctrico PZM. Esto permite desplazar el haz desde adentro hacia afuera de un glóbulo rojo. Así, mediante un fotodetector QPD, se obtiene el comportamiento de una señal en función de este desplazamiento. El rango del barrido en voltaje debe entonces ser convertido a unidades de longitud, típicamente a micrómetros. Esto se realiza aplicando el procedimiento presentado en la sección 4.3. Todo lo anterior, permite obtener una curva de calibración para un haz de interés que representa el comportamiento de la señal en un QPD cuando un haz se mueve desde afuera hacia



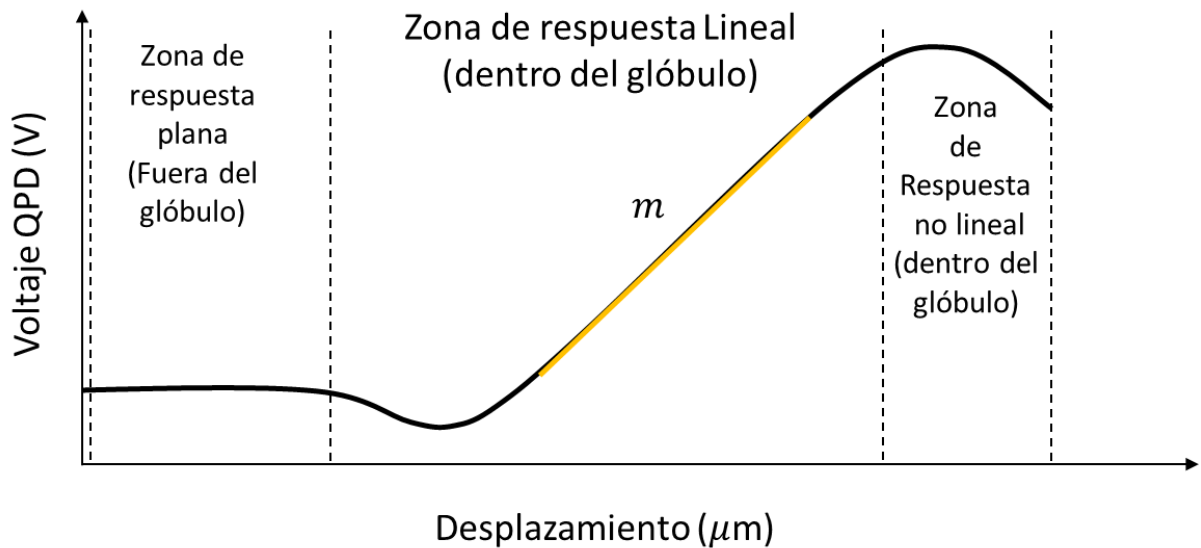


Figura 4.13: Curva de calibración en implementaciones de TRMFS, tanto para haz único como doble. Cuando un haz es desplazado desde dentro hacia afuera de un glóbulo rojo, la señal del QPD muestra tres zonas identificables. La primera zona corresponde al desplazamiento del haz fuera del glóbulo en donde la señal del QPD muestra una respuesta plana. La segunda, es una zona de respuesta lineal de la señal del QPD ante desplazamientos dentro del glóbulo. Finalmente, una tercera zona está asociada a respuestas del QPD que no aseguran linealidad respecto al desplazamiento del haz dentro del glóbulo. Dentro de la zona lineal de respuesta se puede obtener una pendiente  $m$ , la cual, puede ser usada para obtener un factor de conversión que permita convertir esta curva desde volt a nanómetros. Imagen de elaboración propia.

adentro de un glóbulo rojo en función de su desplazamiento en unidades de micrómetros. La curva de calibración permite identificar, como ya se mencionó, tres zonas relevantes. La primera zona corresponde al caso en que la respuesta de la señal del QPD es plana respecto a los desplazamiento del haz. Esta es la situación en que el haz se mueve fuera del glóbulo y es producto de que el QPD es insensible a estos movimientos por diseño del instrumento (plano conjugado). La segunda zona corresponde al caso en que la señal del QPD se comporta de manera lineal con los desplazamientos del haz ya dentro del glóbulo, y una tercera, es donde este desplazamiento del haz dentro del glóbulo no asegura linealidad en la respuesta de la señal del QPD. Es así como, la segunda zona identificada, será de interés para la calibración. Desde la recta de la zona lineal, se puede obtener una pendiente de la respuesta, y por lo tanto, calcular un factor de conversión  $F_C$  de voltaje a nanómetros de la forma que es indicada en la ecuación 4.1

$$F_C = 1/m \quad (4.1)$$

La ecuación 4.1 muestra la forma de obtener el factor de conversión  $F_C$ , el cual, queda

expresado en unidades de  $\mu\text{m}/\text{V}$ . Finalmente, para convertir las señales de fluctuación desde volts a nanómetros para cualquier implementación de TRMFS, es necesario multiplicar este factor  $F_C$  por la señal de fluctuación en unidades de voltaje  $SF_{\text{Volt}}$  obtenida por el QPD. De esta forma, se obtendrá la señal  $SF_{\text{nm}}$ , que será la señal de fluctuación  $SF_{\text{Volt}}$  convertida a nanómetros, tal como se muestra en la ecuación 4.2.

$$SF_{\text{nm}} = F_C \times SF_{\text{Volt}} \quad (4.2)$$

A continuación, serán descritos los experimentos planteados para las implementaciones de TRMFS de haz único y de TRMFS de haz doble, mostrando la realización experimental de la calibración y especificando la metodología de las mediciones realizadas en cada caso.

#### 4.6.1. TRMFS de haz único y efectos del resveratrol en glóbulos rojos: Curvas de calibración y medición de fluctuaciones

A continuación, se describe de manera resumida el experimento realizado con la herramienta TRMFS de haz único, mostrando de manera explícita el procedimiento de calibración y el detalle de los principales parámetros utilizados en las mediciones.

#### Experimento propuesto

La herramienta de TRMFS de haz único ha sido implementada para el estudiar los efectos del resveratrol sobre los glóbulos rojos. Para esto, se midieron las fluctuaciones y parámetros mecánicos de la membrana de glóbulos rojos expuestos a cuatro condiciones diferentes. La primera es la condición control, en donde los glóbulos rojos son expuestos a un medio extracelular que imita sus condiciones normales. La segunda es una condición que expone a los glóbulos rojos a un ambiente con una concentración de 0.2 mM de ácido hipocloroso (HClO). Una tercera condición es la exposición de los glóbulos a un ambiente con una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de resveratrol (RV) y finalmente, una cuarta condición, se relaciona con exponer a glóbulos rojos, previamente incubados en resveratrol, a una concentración de 0.2 mM de HClO. Los resultados de fluctuación y parámetros mecánicos obtenidos a partir del modelo presentado en 2.5.2, son comparados para las diferentes condiciones. Así, las propiedades de los glóbulos cuando estos son expuestos de manera individual sólo a RV y HClO son comparadas respecto a cuando el glóbulo es previamente expuesto a RV y luego a HClO. Esta comparación permite estudiar posibles efectos protectores del RV sobre los glóbulos rojos. Además, la medida de control permite saber cuánto cambian las propiedades de los glóbulos entre una condición normal y las otras condiciones. Los protocolos de preparación de cada una de las cuatro condiciones presentadas son detalladas en 4.4.1.

#### Curva de calibración

En TRMFS de haz único, el procedimiento para obtener una curva de calibración fue realizado al medir las fluctuaciones de cada glóbulo rojo. Así, tres curvas de calibración

fueron obtenidas para cada glóbulo, al inicio, en una fase intermedia y al final del proceso de medición de fluctuaciones. El procedimiento puede ser descrito considerando la figura 3.6, en donde el haz de medición se puede mover en el plano de la muestra al rotar de manera controlada PZM y las señales de fluctuación asociadas a este haz son adquiridas por el fotodetector QPD1. Así, mediante una interfaz de control en Labview, es posible aplicar al PZM un barrido de voltajes en un rango de 0 – 150 V usando pasos de 2 V. El haz es entonces desplazado desde afuera hacia dentro del glóbulo rojo, de izquierda a derecha. Esto permite obtener las curvas de calibración para el haz. De esta manera, el factor de conversión  $F_C$  de la ecuación 4.1, puede ser obtenido al promediar las tres curvas de calibración y ajustar una pendiente en su zona lineal, disminuyendo errores en su cálculo. Un aspecto importante de la obtención de las curvas de calibración es que estas validan la medición de las fluctuaciones de un glóbulo. Si las tres curvas coinciden una sobre otra, indica que el glóbulo estuvo adherido a la superficie del cubreobjeto durante toda la medición, y por lo tanto, las fluctuaciones se deben sólo a su membrana. Para una mejor ejemplificación de lo mencionado, es presentada la figura 4.14. La figura 4.14A muestra dos imágenes del mismo glóbulo rojo pegado al cubreobjeto de la cámara que lo contiene. Pasos de voltaje de 2 V son aplicados al PZM que controla el desplazamiento del haz de medición, cubriendo un rango de 0 – 150 V. Lo anterior, produce el desplazamiento del haz desde afuera hacia adentro del glóbulo y genera una curva de calibración que muestra una zona lineal de respuesta. Para la adquisición de datos en este proceso, se definió el uso de una tasa de muestreo (Sample Rate) de 20 kHz y la adquisición de un número de (Samples to Read) de 20000 datos. Esto implica que, por cada paso de voltaje, se generará un archivo equivalente a la adquisición de datos por 1 segundo. La repetición del barrido genera múltiples curvas de calibración, como las mostradas en la figura 4.14B, en donde se representa de manera directa los cambios de voltajes en la señal del QPD1 al desplazar el haz mediante el barrido de voltajes sobre el PZM. Además, previamente se puede determinar el desplazamiento real producido en el haz en nanómetros al aplicar un voltaje en el rango de 0 – 150 V al PZM, como se indica en 4.3.1. Esto hace posible representar las curvas de calibración con un eje horizontal que indique el desplazamiento del haz en micrómetros en vez del voltajes aplicado al PZM, tal como se muestra en la figura 4.14C. En esta figura, la línea roja muestra de manera representativa el ajuste que se realiza al promedio de las curvas de calibración obtenidas. La pendiente de este ajuste permite calcular el factor de conversión  $F_C$  de voltaje a nanómetros y aplicarlo a las señales de fluctuación en voltaje obtenidas con el QPD1. Por último, es importante hacer notar que las señales del QPD1 involucradas en la calibración y el posterior procesamiento de las señales de fluctuación, se trabajan de manera normalizada, es decir, dividiendo las señales de interés por el voltaje total del QPD1 (ver sección 3.1.4). De acuerdo a esto, si bien en las curvas de calibración de las figuras 4.14B y 4.14C la señal del QPD1 ha sido indicada en voltaje (V), se debe tener en cuenta que, en la práctica, esta unidad simboliza un voltaje normalizado o unidades arbitrarias.

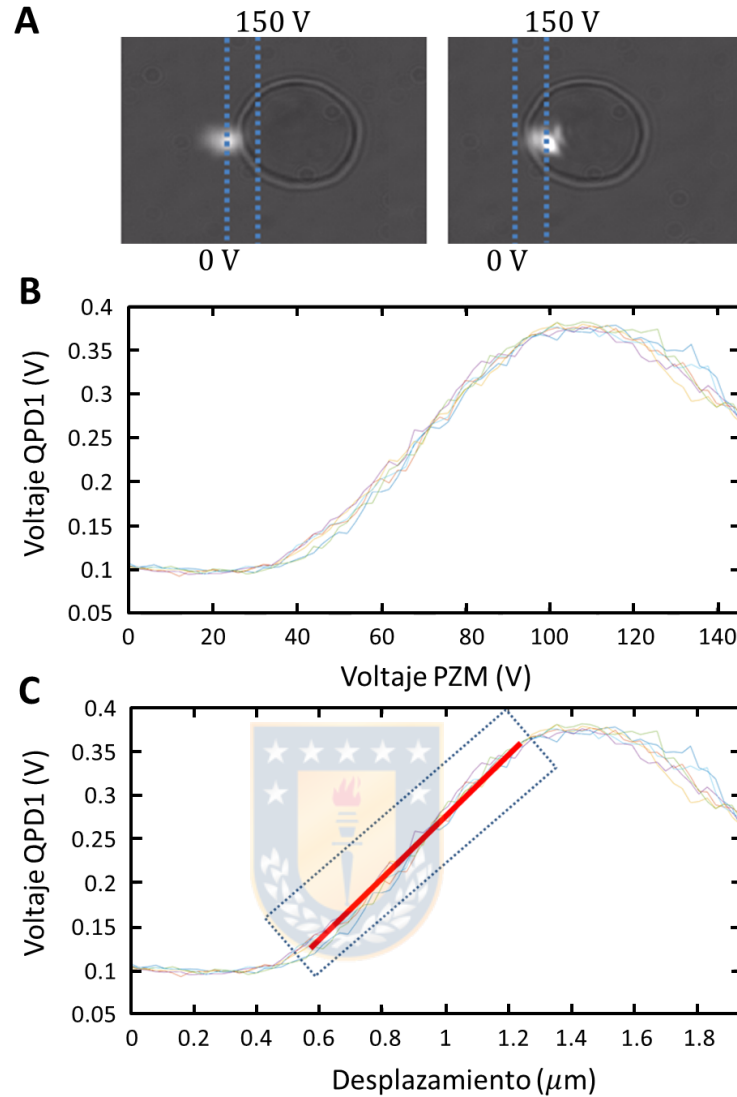


Figura 4.14: Proceso de obtención de curva de calibración para implementación de TRMFS de haz único. **A** Desplazamientos del haz, desde afuera hacia adentro del glóbulo rojo medido, al aplicar voltajes en el rango 0 – 150 V a PZM que controla la posición del haz de medición en el plano de la muestra. **B** Representación de múltiples curvas de calibración obtenidas desde un glóbulo rojo al aplicar procedimiento mostrado en **A**. Curvas de calibración aproximadamente una sobre otra dan cuenta de que el glóbulo, al cual se le midieron fluctuaciones, estuvo pegado correctamente a la superficie del cubreobjeto durante toda la medición. **C** Señales de calibración mostradas en **B** pero esta vez representadas en un gráfico de señal del QPD1 en función del desplazamiento del haz en micrómetros. La línea roja representa el ajuste lineal al promedio de las curvas de calibración. Su pendiente  $m$  permite calcular el factor de conversión  $F_C$  para pasar desde voltaje a nanómetros las señales de fluctuación adquiridas mediante un QPD1. Las señales de calibración en las figuras **B** y **C** están indicadas en voltaje (V), sin embargo, en la práctica, esta unidad representa un voltaje normalizado o unidades arbitrarias pues las señales del QPD1 han sido normalizadas. Imagen de elaboración propia.

## Medición

Para el proceso de medición en TRMFS de haz único, se midieron las fluctuaciones de  $N = 100$  glóbulos rojos para la condición de control,  $N = 20$  para la condición en que son expuestos a 0.2 mM de HClO,  $N = 20$  cuando son incubados en resveratrol por una hora y  $N = 20$  para la condición en que los glóbulos son incubados por una hora a RV y luego expuestos a HClO (RV+ HClO). Para todas las condiciones, fueron medidos 20 archivos de fluctuación de 10 segundos por cada glóbulo. Lo anterior equivale a definir una tasa de muestreo de 20 kHz y 200000 datos por archivo. Estos parámetros son definidos en la interfaz de control mostrada en 4.2.1. Para realizar la medición, primero se obtiene una primera curva de calibración y se escoge un voltaje central dentro de su zona lineal. Mediante la interfaz de control Labview, se debe aplicar ese voltaje al PZM. Esto desplaza al haz de medición hacia una posición dentro del glóbulo y se comienza la adquisición de las fluctuaciones. En la posición indicada, se asegura la linealidad entre las variaciones en la señal adquirida y las fluctuaciones de la membrana. Luego de medidos 10 archivos de fluctuación, se debe obtener una segunda curva de calibración. Se vuelve entonces a aplicar al PZM el voltaje escogido de la zona lineal de la primera curva de calibración y se miden nuevamente 10 archivos de fluctuación. Finalmente, se debe obtener una tercera curva de calibración. Si las tres curvas de calibración coinciden, son válidos los 20 archivos de fluctuación del glóbulo. Esto se repite para cada glóbulo medido en cada condición.

Por su parte, para calcular las fluctuaciones de un glóbulo, se calculó la desviación estándar (STD) de cada uno de sus 20 archivos de fluctuación. Estas se promediaron y se obtuvo una STD promedio a la cual denominamos fluctuación del glóbulo. Esto se realizó para cada uno de los  $N$  glóbulos de una condición dada. Luego, las fluctuaciones de los  $N$  glóbulos son promediadas y se obtiene un valor de fluctuación promedio representativo de los  $N$  glóbulos medidos asociados a una condición específica. El análisis y comparación estadística entre los grupos de datos de cada condición fue realizada mediante un test ANOVA de dos vías (Two-way ANOVA) y un Test Tukey. La significancia estadística fue definida como  $P < 0.01$ .

Finalmente, para determinar los parámetros mecánicos de la membrana de un glóbulo rojo, se calculó la densidad espectral de potencia (PSD) de sus 20 archivos de fluctuación. Esto se consigue aplicando la transformada rápida de Fourier (FFT) mediante el uso de MATLAB. Las densidades de potencia de todos los archivos se promedian y se obtiene una PSD representativa del glóbulo. A esta última PSD, se le ajusta entonces la ecuación 2.33 del modelo presentado en 2.5.2 para frecuencias mayores a 10 Hz, y de esta manera, se obtiene el módulo de flexión ( $\kappa$ ) de la membrana del glóbulo. Esto se realiza con cada uno de los  $N$  glóbulos medidos en una condición dada, y así, promediando todos valores de  $\kappa$ , se obtiene un valor representativo promedio de este parámetro para tal caso. A modo de ejemplo, en la figura 4.15 se muestra el ajuste del modelo de membrana sobre la PSD promedio de un glóbulo en una condición determinada para TRMFS de una pinza.

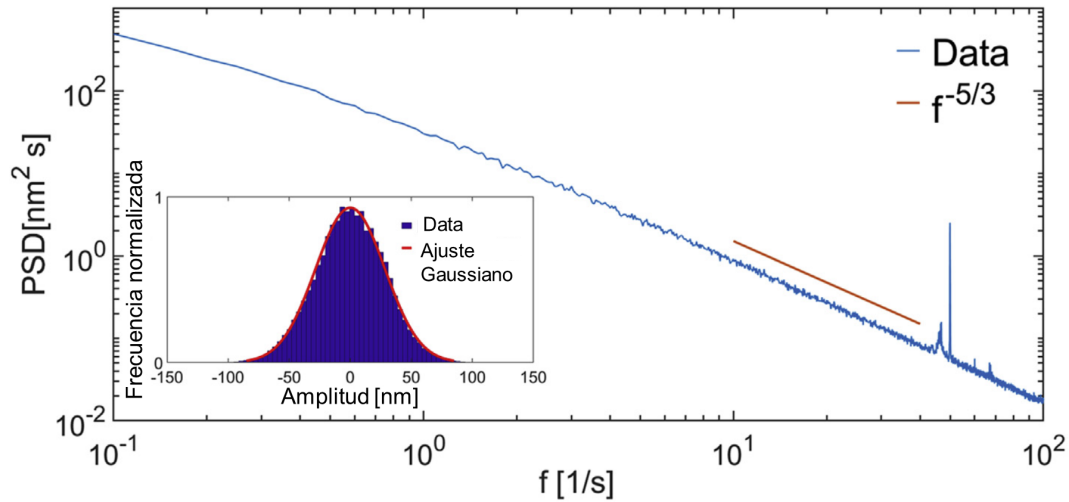


Figura 4.15: Ajuste del modelo de membrana sobre la PSD promedio de la membrana de un glóbulo rojo extraída desde sus fluctuaciones bajo una condición en particular para TRMFS de una pinza. La PSD ha sido graficada hasta los 100 Hz de frecuencia y la línea roja representa la zona en donde se realiza el ajuste. Esta zona corresponde a frecuencias mayores a 10 Hz y, el ajuste del modelo de membrana dentro de ella, permite obtener el valor del módulo de flexión ( $\kappa$ ) de una membrana. La figura interna, representa la distribución Gaussiana de las fluctuaciones desde las cuales se extrajo la PSD. Imagen de elaboración propia.

#### 4.6.2. TRMFS de doble haz y efectos de la glucosa en glóbulos rojos: Curvas de calibración y medición de fluctuaciones

A continuación, se describe de manera resumida el experimento realizado con la herramienta TRMFS de doble haz, mostrando de manera explícita el procedimiento de calibración y el detalle de los principales parámetros utilizados en las mediciones.

### Experimento propuesto

Para estudiar los efectos de la glucosa (D-glucosa) sobre las fluctuaciones y parámetros mecánicos de la membrana de los glóbulos rojos, estos se sometieron a tres diferentes concentraciones de D-glucosa. La primera es 5.5 mM y es considerada como condición normal o control. Las otras dos son 12.5 mM y 25 mM, correspondientes a ambientes hiperglicémicos. A partir de esto, fueron consideradas dos mediciones independientes basadas en simetría y factibilidad técnica. Así, la propuesta experimental considera la medición en dos puntos diferentes de la membrana de un glóbulo rojo, los cuales, están asociados a los haces de medición  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$ . Ambos haces, poseen polarizaciones ortogonales entre sí, siendo  $S_{|H\rangle}$  el haz con polarización horizontal y  $S_{|V\rangle}$  el haz con polarización vertical. Ambos están localizados en el perímetro del glóbulo rojo y separados una distancia equivalente a su diámetro. Adicionalmente, la adquisición de doble haz del experimento propuesto



ayuda a evaluar la simetría de la estructura del glóbulo rojo. En este tipo de mediciones es deseable un mayor número de puntos, sin embargo, técnicamente no es sencillo obtener dicha configuración debido a la interferencia óptica y las restricciones de alineación.

## Curvas de calibración

En la implementación de TRMFS de doble haz, se repite el procedimiento de la obtención de las curvas de calibración realizada en TRMFS de un sólo haz. Sin embargo, esta vez se realiza para dos haces. Para describir el procedimiento, considere el montaje de la figura 3.7. Dos haces ortogonalmente polarizados,  $S_{|H\rangle}$  (con polarización horizontal) y  $S_{|V\rangle}$  (con polarización vertical), se pueden mover en el plano de la muestra al rotar de manera controlada PZM1 y PZM2, respectivamente. Además, las señales de QPD1 están asociadas a  $S_{|H\rangle}$  y las del QPD2 a  $S_{|V\rangle}$ . Así, mediante la interfaz de control en Labview presentada en 4.2.3, es posible aplicar a PZM1 y PZM2 un barrido de voltajes en el rango 0 – 150 V en pasos de 2 V para el desplazamiento de  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$ . Ambos haces son entonces desplazados desde afuera hacia dentro del glóbulo rojo, así,  $S_{|H\rangle}$  se mueve de izquierda a derecha y  $S_{|V\rangle}$  de derecha a izquierda. Esto permite obtener las curvas de calibración para cada haz. En particular, dos curvas de calibración son obtenidas para  $S_{|H\rangle}$  y para  $S_{|V\rangle}$  al medir las fluctuaciones de un glóbulo. La adquisición de estas curvas se realiza antes de comenzar las medidas de fluctuación y después de terminarlas. De esta manera, para cada haz de medición, se promedian sus dos curvas de calibración asociadas, obteniendo una curva promedio para  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$ . A partir de la pendiente de la zona lineal de estas, se puede obtener el factor de conversión  $F_C$  para las señales de fluctuación asociadas a cada uno de estos haces. Este procedimiento disminuye errores en la determinación de  $F_C$ . Además, si ambas curvas coinciden una sobre otra, indica que el glóbulo estuvo adherido a la superficie del cubreobjeto durante toda la medición, y por lo tanto, las fluctuaciones se deben sólo a su membrana. Este hecho validará las mediciones realizadas. Para ejemplificar de mejor manera el procedimiento realizado y lo antes mencionado, es presentada la figura 4.16 en donde se muestra el procedimiento de obtención de las curvas de calibración para la implementación de TRMFS de dos haces ortogonales. Las figuras 4.16A-4.16C muestran la imagen de un glóbulo rojo y el desplazamiento de los haces ortogonales  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  desde afuera hacia adentro de él. Así, para cada haz moviéndose de esta manera, se generará una curva de calibración. Una representación de lo anterior, es mostrado en la 4.16D y 4.16E, en donde para cada haz, se han obtenido dos curvas de calibración, una antes (puntos rojos) y otra después (puntos amarillos) de las mediciones de la fluctuación en el glóbulo. Para lograr lo anterior, los desplazamientos de  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  fueron realizados al aplicar voltajes en el rango 0 – 150 V a los PZM1 y PZM2 en pasos de 2 V. A su vez, para la adquisición de datos en este proceso, se definió el uso de una tasa de muestreo (Sample Rate) de 20 kHz y la adquisición de un número de 20000 datos (Samples to Read). Esto implica que, por cada paso de voltaje, se generará un archivo equivalente a la adquisición de datos por 1 segundo.



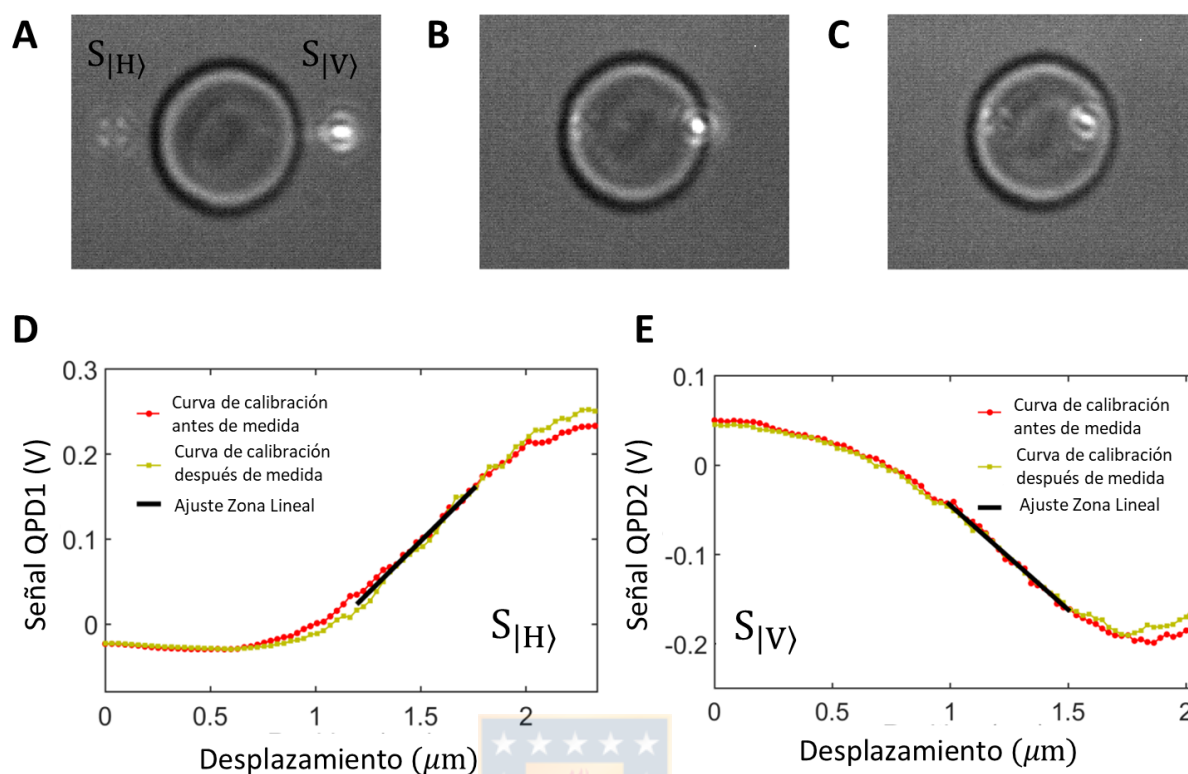


Figura 4.16: Procedimiento de obtención de las curvas de calibración para la implementación de TRMFS de dos haces ortogonales. **A-C** Desplazamiento de los haces ortogonales  $S_{|H)}$  y  $S_{|V)}$  desde afuera hacia adentro de un glóbulo rojo para la obtención de la curva de calibración.  $S_{|H)}$ , asociado a la señal obtenida en el QPD1, y  $S_{|V)}$ , asociado a la señal obtenida en QPD2, representan haces con polarización horizontal y vertical, respectivamente. Los desplazamientos de  $S_{|H)}$  y  $S_{|V)}$  son realizados al aplicar voltajes en el rango 0 – 150 V a los PZM1 y PZM2, respectivamente, con pasos de 2 V. **D** y **E** muestran las dos curvas de calibración obtenidas para  $S_{|H)}$  y  $S_{|V)}$  al desplazar cada haz desde afuera hacia adentro del glóbulo antes (puntos rojos) y después (puntos amarillos) de la medición de la fluctuación en el glóbulo. En estas curvas de calibración, si el eje del desplazamiento es representado en voltaje (el aplicado a cada espejo piezoeléctrico según corresponda) en vez de unidades de distancia, se puede escoger un voltaje para PZM1 y PZM2 que permita posicionar los haces  $S_{|H)}$  y  $S_{|V)}$ , respectivamente, en la zona de medición de fluctuaciones. Esta es una zona en donde el fotodetector asociado a cada haz, responderá linealmente a las fluctuaciones. La línea negra representa el ajuste que se realiza luego de las mediciones de fluctuación para determinar la pendiente  $m$  y por lo tanto el factor de conversión para pasar de señales de fluctuación en volt a nanómetros. Las señales de calibración en las figuras **D** y **E** están indicadas en voltaje (V), sin embargo, en la práctica, esta unidad representa un voltaje normalizado o unidades arbitrarias pues las señales del QPD1 y QPD2 han sido normalizadas. Imagen de elaboración propia.

Adicionalmente, se puede determinar el desplazamiento en nanómetros producido en cada haz al aplicar un voltaje en el rango de 0 – 150 V a su respectivo espejo piezoeléctrico, como se indica en 4.3.2. Esto hace posible representar las curvas de calibración de  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  con un eje horizontal que indique el desplazamiento del haz en micrómetros en vez del voltajes aplicado al espejo piezoeléctrico correspondiente. La representación de las curvas de calibración con un eje horizontal que indica el desplazamiento en micrómetros se realiza para cada haz como es mostrado en las figuras 4.16D y 4.16E. La línea negra en estas figuras, representan el ajuste sobre una curva promedio calculada desde las dos curvas de calibración en cada haz. Esto, permite calcular la pendiente  $m$  y los factores  $F_C$  asociados a  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  mediante el uso de la ecuación 4.1. Este factor permite, usando la ecuación 4.2, transformar las señales de voltaje de los fotodetectores a unidades de nanómetros. Finalmente, es importante mencionar que, al igual que como es indicado en la sección 4.6.1 para el caso de TRMFS de una pinza, las señales del QPD1 y QPD2 involucradas en la calibración, y el posterior procesamiento de las señales de fluctuación, se trabajan de manera normalizada, es decir, dividiendo las señales de interés por el voltaje total del QPD (ver sección 3.1.4). De esta manera, si bien en las curvas de calibración de las figuras 4.16D y 4.16E las señales de los QPDs han sido indicadas en voltaje (V), se debe tener en cuenta que, en la práctica, esta unidad simboliza un voltaje normalizado o unidades arbitrarias.

## Medición

Para el proceso de medición en TRMFS de doble haz, se obtuvieron las fluctuaciones de  $N = 103$ ,  $N = 61$  y  $N = 47$  glóbulos rojos para las concentraciones de 5.5, 12.5 y 25 mM de D-glucosa, respectivamente. Para cada glóbulo independiente de una concentración en particular, se midieron 20 archivos de fluctuación de 10 segundos a una tasa de adquisición de 20 kHz. Estos parámetros son definidos en la interfaz de control mostrada en 4.2.2. Para realizar la medición de fluctuaciones de un glóbulo, se adquiere una primera curva de calibración para los haces de medición  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$ . Desde cada una de ellas, se escoge un voltaje central dentro de su zona lineal y se aplica los espejos piezoeléctricos correspondientes. Esto desplaza a los haces de medición hacia una posición dentro del glóbulo y se comienza la adquisición de los 20 archivos de fluctuación para cada uno. La posición de medición conseguida para cada haz asegura la linealidad entre las variaciones en la señal adquirida y las fluctuaciones de la membrana. Esto se repite en la medición de cada glóbulo sometido a una concentración particular.

Por su parte, para calcular las fluctuaciones de un glóbulo con un haz en particular, se calculó la desviación estándar (STD) de cada uno de sus 20 archivos de fluctuación. Estas se promediaron y se obtuvo una STD promedio a la cual denominamos fluctuación del glóbulo. Esto se realizó para cada uno de los  $N$  glóbulos de una condición dada. Luego, las fluctuaciones de los  $N$  glóbulos son promediadas y se obtiene un valor de fluctuación promedio representativo de los  $N$  glóbulos medidos asociados a una concentración específica. Esta determinación de las fluctuaciones se debe realizar tanto para el haz de medición  $S_{|H\rangle}$  como para  $S_{|V\rangle}$ , por separado. El análisis y comparación estadística entre los gru-

pos de datos de cada condición, para cada haz, fue realizada mediante un test ANOVA de una vía (One-way ANOVA) y un Test Tukey sin definir una significancia estadística previa.

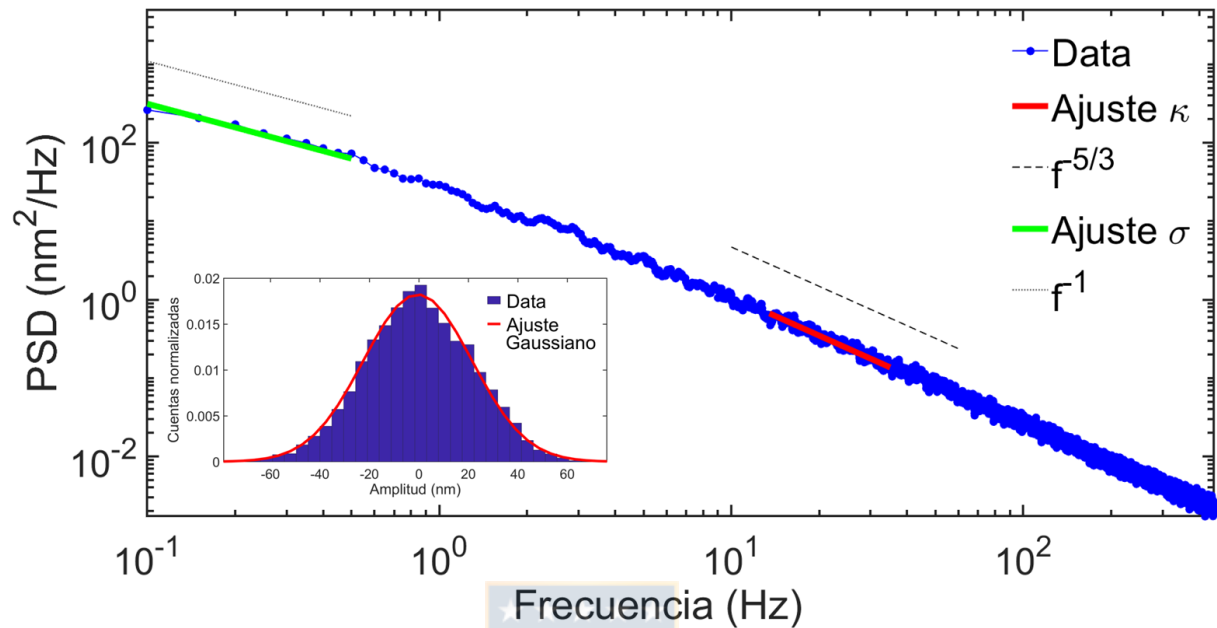


Figura 4.17: Ajuste del modelo de membrana a la PSD promedio extraída desde las fluctuaciones de membrana de un glóbulo rojo sometido a una concentración de D-glucosa en particular. Esta PSD está asociada a una de las trampas con que se midió el glóbulo y ha sido graficada hasta aproximadamente los 400 Hz de frecuencia mediante puntos azules unidos por una línea. Mediante una línea verde y una punteada se representa el ajuste y comportamiento de la función teórica a frecuencias bajas del modelo de membrana utilizado (frecuencias menores a 1 Hz), respectivamente. Este ajuste permite determinar el parámetro de tensión de membrana  $\sigma$ . Por su parte, mediante una línea roja y otra segmentada, se representa el ajuste y comportamiento teórico de la función del modelo de membrana usado para frecuencias altas (frecuencias mayores a 10 Hz), respectivamente. El ajuste a frecuencias altas permite la obtención del módulo de flexión de la membrana. Finalmente, la figura interna representa la distribución Gaussiana de uno de los archivos de fluctuación de la membrana usado para la extracción de la PSD. Imagen de elaboración propia.

Finalmente, para determinar los parámetros mecánicos de la membrana de un glóbulo rojo, se calculó la densidad espectral de potencia (PSD) de los 20 archivos de fluctuación para cada punto de medición por separado. Esto se consigue aplicando la transformada rápida de Fourier (FFT) mediante el uso de MATLAB. Las densidades de potencia de todos los archivos se promedian y se obtiene una PSD representativa para el punto de medición del glóbulo. A esta, se le ajustan las ecuaciones 2.32 y 2.33 del modelo presentado en 2.5.2 para frecuencias menores a 1 Hz y mayores a 10 Hz, respectivamente. Es así que, el ajuste

de la ecuación 2.32 a bajas frecuencias ( $< 1$  Hz), permite obtener el parámetro de tensión  $\sigma$  de la membrana del glóbulo, y el ajuste de la ecuación 2.33 a altas frecuencias ( $> 10$  Hz), entrega el módulo de flexión  $\kappa$ . Esto se realiza con cada uno de los  $N$  glóbulos medidos para una concentración determinada. De esta manera, promediando todos los valores de  $\sigma$  y  $\kappa$ , se obtienen los valores representativos promedio de estos parámetros para la zona de la membrana en donde se midió. Este procedimiento debe ser realizado tanto para el haz de medición  $S_{|H}$  como para  $S_{|V}$  por separado, los cuales, representan la medición en dos zonas diferente de la membrana del glóbulo. A modo de ejemplo, se muestra en la figura 4.17 el ajuste para bajas y altas frecuencias del modelo de membrana sobre la PSD promedio de un glóbulo sometido a una concentración de D-glucosa determinada. En esta figura, el ajuste de baja frecuencia del modelo es indicado con una línea verde y el de altas frecuencias con una línea roja. Además, una línea punteada y otra discontinua indican el comportamiento teórico de las funciones de ajuste para bajas y altas frecuencias, respectivamente.

## 4.7. Pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte: Factor de conversión y mediciones para su caracterización

A continuación, se describe de manera resumida el experimento realizado para pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, detallando de manera explícita el procedimiento de calibración y el cálculo de los principales parámetros de caracterización.

### Experimento propuesto

Para la implementación de las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, presentada en la figura 3.8, se propone la caracterización de sus principales parámetros de funcionamiento. Lo anterior, implica la derivación de las frecuencias de corte  $f_c$  y la constante de difusión de Einstein experimental  $D_{\text{Volt}}$  para los ejes X e Y de las trampas  $S_{|H}$  y  $S_{|V}$  a partir del análisis de las densidades espectrales de potencia (PSDs) de las señales de posición de las esferas atrapadas. Mediante el uso de los parámetros anteriores, y de una constante de difusión de Einstein  $D$  teórica, es posible determinar un parámetro de conversión  $\beta$  de voltaje a nanómetros para las señales de posición de las esferas atrapadas, así como también, de la constante de rigidez  $\bar{\kappa}$  en ambos ejes de las trampas. El uso del factor  $\beta$  de las señales de ambos ejes de las trampas, permite convertirlas desde voltaje a nanómetros para estimar los desplazamientos de las esferas dentro del potencial de atrapamiento. Este mismo factor se puede usar también para la conversión de las PSDs de las señales de posición desde  $V^2/\text{Hz}$  a  $\text{nm}^2/\text{Hz}$ . Todo lo anteriormente planteado, se fundamenta en trabajos tanto teóricos como experimentales relacionados con calibración y desarrollo de algoritmos de análisis de pinzas ópticas [83–85]. Además, se desea estudiar los efectos en el atrapamiento que genera la cercanía entre trampas. La motivación de lo anterior se basa en la posible existencia de imperfecciones en la ortogonalidad de las polarizaciones de los

haces. La consecuencia de lo anterior, sería una interacción de las trampas debido a la interferencia de su luz cuando se encuentran muy cercanas, lo cual afectaría las fuerzas ejercidas por cada una de ellas. En consideración de todo lo anterior, se diseñó una prueba en donde dos esferas de poliestireno de  $2 \mu\text{m}$  de diámetro fueron atrapadas mediante las trampas  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  realizando su caracterización para cuatro condiciones de separación entre ellas mediante el uso de una interfaz de control y adquisición 4.2.3.

Para el control de las posiciones de las trampas mediante la interfaz, se debe considerar que el rango de voltajes aplicable al espejo piezoeléctrico PZM2 que mueve la trampa  $S_{|V\rangle}$  está dividido en 2200 posibles pasos. Así, la aplicación de cuatro diferentes cantidades de pasos sobre este espejo, correspondientes a 0, 500, 1000 y 2000 pasos para el experimento, corresponden a cuatro diferentes separaciones entre los haces. La distancia entre los haces cuando 0 pasos son aplicados, corresponde a una en donde ambas esferas atrapadas están visualmente juntas pero sin entrar en contacto. Adicionalmente, se debe considerar que a PZM1 no se le aplica ningún voltaje, permaneciendo fija la trampa  $S_{|H\rangle}$ . Además, la prueba experimental considera que ambas trampas tengan la misma potencia. La realización de todo el procedimiento antes planteado permite calcular y ajustar, para cada distancia, la PSD de cada trampa, extrayendo desde aquí, las frecuencias de corte de cada una de ellas y otros parámetros que permiten caracterizar el instrumento.

### Curva de calibración, factor de conversión $\beta$ y derivaciones de parámetros de caracterización

Los métodos para la conversión de señales desde voltajes a nanómetros en pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte son variadas. Para el presente trabajo, un factor de conversión  $\beta$  fue estimado para las señales de posición X e Y de las esferas atrapadas en  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  a partir de sus PSDs. Este factor, permite realizar la transformación de voltaje a nanómetros de estas señales, y su estimación para cada señal fue realizada en base a un procedimiento simplificado de una técnica estándar de calibración [85]. La simplificación de la técnica tiene relación con que, para este trabajo, se asumió la viscosidad del agua ( $\eta$ ) para el cálculo de una constante de difusión de Einstein teórica  $D$ , que junto a la experimental  $D_{\text{Volt}}$  extraída desde la PSD de cada señal, permiten estimar un factor  $\beta$ . A diferencia de esto, en la técnica estándar de calibración  $\eta$  es directamente medida para el cálculo de  $D$ . La obtención del factor  $\beta$  no sólo permite transformar las señales de voltaje a nanómetros, sino que también, representar sus PSDs en unidades de  $\text{nm}^2/\text{Hz}$  y determinar la constante de rigidez  $\bar{\kappa}$  de ambos ejes de las trampas mediante su combinación con las frecuencias de corte  $f_c$  obtenidas desde las PSDs de cada señal. Basados en trabajos fundamentales de análisis en pinzas ópticas [83–85], a continuación es descrito el procedimiento para obtener un factor de conversión  $\beta$  para los ejes X e Y de cada trampa de la pinza óptica doble de atrapamiento fuerte, cuando entre ellas, existe una distancia de separación dada. Además, se indica de manera explícita el uso de  $\beta$  para la derivación de los parámetros característicos.

- Para comenzar con el proceso de calibración, cada pinza del sistema,  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$ , debe atrapar una esfera de poliestireno y en donde una distancia arbitraria de separación debe ser definida entre ellas. Esto permite obtener las señales temporales de posición de cada esfera dentro de su trampa. Las señales de cada trampa son adquiridas con una tasa de muestreo (Sample rate) de 20 kHz y un número de datos de adquisición (Samples to read) de 200000. Esto equivale a registrar el movimiento de las esferas de cada trampa por 10 segundos. Tanto para la definición de los parámetros de adquisición como para realizar las mediciones, es usada la interfaz de control mostrada en 4.2.3.
- Obtenidas las señales de desplazamiento de cada trampa, un programa estándar desarrollado en MATLAB [84] es usado para realizar el análisis de la PSD de cada una de ellas por separado. Este programa, se basa en el análisis presentado en 2.2 y permite entre otras cosas, realizar el ajuste teórico de una función Lorentziana que representa el movimiento de una esfera confinada en una trampa óptica. Esta función es indicada en 2.21. Este ajuste es realizado a cada trampa y arroja una frecuencia de corte  $f_c$  y un valor para la constante de difusión de Einstein  $D_{\text{Volt}}$  en unidades de  $\text{V}^2/\text{s}$  para los eje X e Y de cada una de ellas. Aquí se debe recordar que  $D_{\text{Volt}}$  está asociado a la difusión de un objeto tal como una esfera dentro de un fluido. Para ejemplificar lo indicado, la figura 4.18 muestra la interfaz del programa de análisis utilizado y un gráfico del ajuste teórico a la PSD para los ejes X e Y de una de las trampas. En particular, la figura 4.18A muestra la interfaz del programa para el ajuste de una PSD teórica sobre las PSDs experimentales de las señales X e Y de cada trampa. Para una correcta representación de la PSD experimental y del ajuste teórico sobre ella, se pueden definir diferentes parámetros relacionados con la medición, tales como, la densidad del fluido y radio de las esferas utilizadas. Adicionalmente, es posible aplicar filtros en frecuencia a las señales analizadas, eliminación de Cross-Talk y selección de rangos de ajuste, entre otros. Por su parte, las figuras 4.18B y 4.18C muestran el ajuste de la Lorentziana teórica sobre las señales X e Y ya señaladas. Este ajuste corresponde a la Lorentziana teórica para partículas esféricas atrapadas por una pinza óptica y entrega el valor de la frecuencia de corte  $f_c$  y de la constante de difusión de Einstein  $D_{\text{Volt}}$  para cada eje de la trampa analizada.
- Obtenido el valor de la frecuencia de corte y  $D_{\text{Volt}}$  para el eje X e Y de una trampa analizada, considere ahora la ecuación del coeficiente de arrastre que ya ha sido presentada en 2.2 en la ecuación 2.12 .

$$\gamma = 6\pi\eta r.$$

Recordemos que  $\eta$  es la viscosidad de un medio en donde una esfera de radio  $r$  se está moviendo. Así, el coeficiente de arrastre representa el grado de fricción de la esfera dentro del fluido por el cual se desliza. Considerando el uso de esferas de  $2 \mu\text{m}$  de diámetro, el coeficiente de arrastre entonces es calculado utilizando  $r = 1 \mu\text{m}$



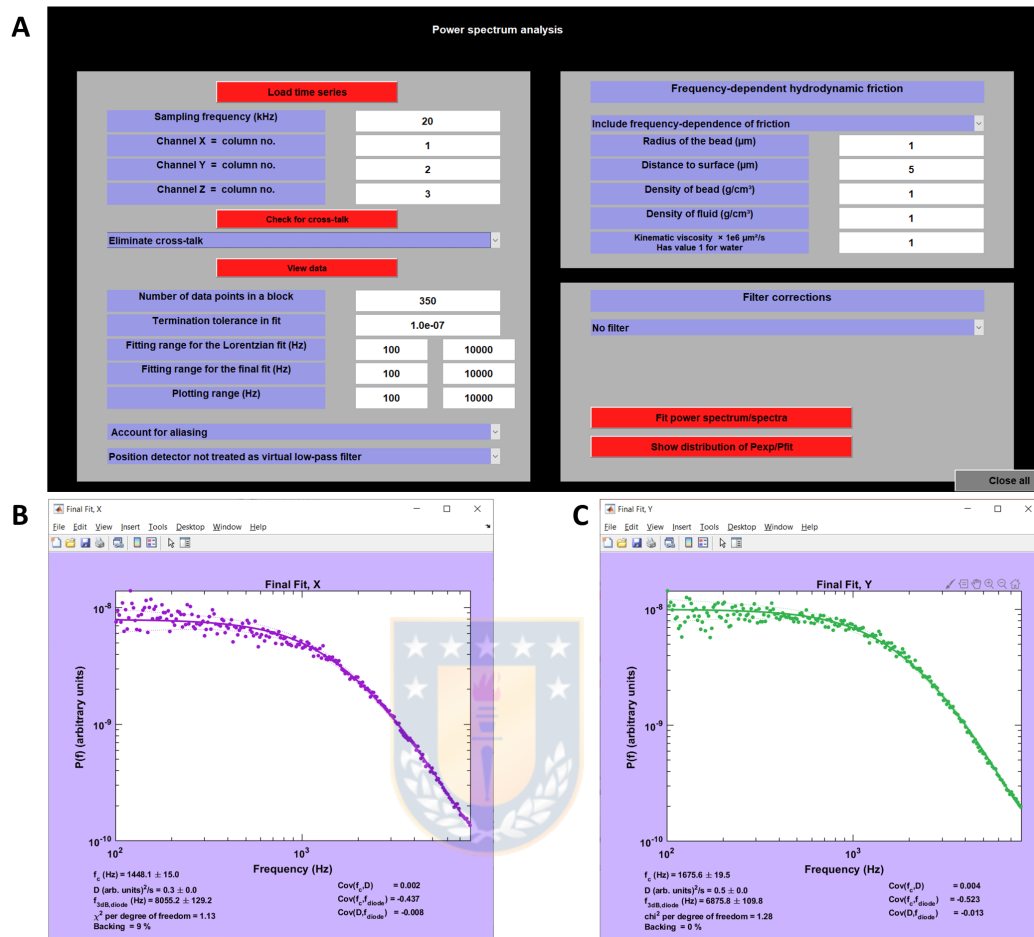


Figura 4.18: Procedimiento y herramientas para la calibración en pinza ópticas dobles de atrapamiento fuerte. La conversión de las señales de desplazamiento de las esferas dentro de cada trampa son convertidas desde voltaje a nanómetros calculando un factor de conversión  $\beta$  para cada trampa. **A** Programa en MATLAB utilizado para el ajuste de las PSD de las señales de desplazamiento de las esferas en cada trampa. Su interfaz permite el cálculo de la PSD de los ejes X e Y de la señal de cada trampa, como también, definir diferentes parámetros relacionados con la medición, tales como, densidades de fluidos y radios de las esferas que fueron utilizados. Además, se pueden aplicar filtros en frecuencia a las señales analizadas, eliminación de Cross-Talk y selección de rangos de ajuste entre otros. **B-C** Ajuste de una Lorentziana teórica sobre las señales X e Y de posición de una esfera atrapada en una trampa. El ajuste corresponde a la Lorentziana teórica para partículas esféricas atrapadas por una pinza óptica y entrega el valor de la frecuencia de corte  $f_c$  y de la constante de difusión de Einstein  $D_{\text{Volt}}$  para cada eje de la trampa.



y  $\eta = 10^{-3} \text{ Pa} \times \text{s}$  (viscosidad dinámica del agua a 293.15 K o 20 °C). Por otro lado, considere la constante de difusión de Einstein  $D$  ya presentada en 2.2.

$$D = \frac{k_B T}{\gamma}.$$

La expresión anterior, asocia el coeficiente de arrastre  $\gamma$  con la constante de difusión de Einstein  $D$  que da cuenta de la difusión de una partícula dentro de un fluido, es decir, la facilidad con que por ejemplo una esfera se mueve dentro de este. Además, se debe indicar que  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura en grados Kelvin del fluido considerado. Aquí, se asume  $T = 293.15 \text{ K}$  (20 °C). Ahora, de acuerdo a [85], la relación entre el  $D$  calculado y el  $D_{\text{Volt}}$  extraído desde el ajuste de la PSD será

$$D = \beta^2 D_{\text{Volt}}. \quad (4.3)$$

Por lo tanto, el factor de conversión para pasar las señales desde voltaje a nanómetros es

$$\beta = \sqrt{\frac{D}{D_{\text{Volt}}}}. \quad (4.4)$$

Este resultado, junto a la determinación experimental de la frecuencia de corte  $f_c$  para cada eje de la trampa analizada y el uso de la ecuación 2.14, permiten determinar la constante de rigidez  $\bar{\kappa}$  de ambos ejes de una trampa, tal como se muestra abajo.

$$\bar{\kappa} = \frac{2\pi f_c k_B T}{\beta^2 D_{\text{Volt}}} \quad (4.5)$$

Este análisis debe ser realizado tanto para la trampa  $S_{|H\rangle}$  como para  $S_{|V\rangle}$ .

## Medición

Para el experimento propuesto, dos esferas atrapadas fueron posicionadas mediante la interfaz 4.2.3 a cuatro diferentes distancias entre ellas. Al piezoeléctrico PZM2 que controla la posición de la trampa  $S_{|V\rangle}$ , se le aplicaron cuatro diferentes cantidades de pasos correspondientes a 0, 500, 1000 y 2000 pasos de voltaje. El voltaje 0 corresponde a las esferas atrapadas posicionadas una junto a la otra pero sin tocarse. Las otras cantidades corresponden a separaciones cada vez mayores entre ellas. Estas cantidades de pasos usadas pueden ser traducidas a separaciones reales entre los bordes de las esfera de acuerdo a la calibración de la figura 4.9 realizada en 4.3.3. De lo anterior, se puede indicar que las cantidades de pasos de voltaje 0, 500, 1000 y 2000 corresponden aproximadamente a

separaciones de 0, 2.85, 5.71 y 11.42  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Para cada separación, se definió en la interfaz de control de la figura 4.4 una tasa de adquisición de 20 kHz y una cantidad de datos de 200000. De esta manera, se adquirió 1 archivo de 10 segundos de las señales de cada trampa,  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$ . Es importante tener presente que las señales corresponden entonces a la posición temporal de cada esfera dentro de su trampa. Por otro lado, para operar en el régimen de atrapamiento, se suministró al láser un 60% de la corriente que es capaz de entregar su caja controladora. Traducido a potencia, esto equivale a una emisión de salida de alrededor de 3.254 W, según la calibración de potencia del láser mostrada en la figura 4.1.

El análisis de las señales de  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$ , para cada distancia de separación, se realizó utilizando el programa mostrado en la figura 4.18A. Desde este, se extrajeron las frecuencias de corte  $f_c$  y los  $D_{\text{Volt}}$  para los ejes X e Y de cada trampa. Esto se hizo ajustando la PSD teórica de la ecuación 2.21 a las PSDs de las señales de posición de ambos ejes de una partícula atrapada, tal como se muestra en la figura 4.18B. Para esto, en la interfaz del programa de análisis se definió un ajuste de cada PSD en el rango de 100 a 8000 Hz y se aplicó un filtro de 1 parámetro (*fdiode-eff*). Además, para correcciones en el ajuste, se definieron parámetros físicos como el radio de la esfera atrapada ( $r = 1 \mu\text{m}$ ), la densidad de la esfera ( $1.04 \text{ g/cm}^3$ ) y la distancia de la esfera a la superficie del cubreobjeto. Este último parámetro fue definido arbitrariamente como 5  $\mu\text{m}$ .

Todo lo anterior, permite la obtención de los parámetros de conversión  $\beta$  para los ejes X e Y de cada trampa de manera de realizar el proceso de calibración y convertir las señales de posición de las esferas de cada trampa desde voltaje a nanómetros. A partir de las señales convertidas, se calcula una STD para ambos ejes de una señal, pudiéndose describir un desplazamiento característico de las esferas atrapadas en el potencial de cada trampa. Además, los factores de conversión permiten la obtención de las constantes de rigidez  $\bar{\kappa}$  en los ejes X e Y de cada trampa y la conversión de las PSDs de las señales de fluctuación de las esferas atrapadas a unidades de  $\text{nm}^2/\text{Hz}$ . Por último, cabe mencionar que el programa de análisis [84] utilizado para los ajustes y extracción de parámetros de caracterización, trabaja con señales del QPD normalizadas (ver sección 3.1.4), lo cual, es considerado al momento de realizar procesamientos y conversiones que dan origen a los resultados de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte.

# Capítulo 5

## Resultados y discusión

En el presente capítulo, son presentados los resultados de los experimentos realizados con las herramientas de TRMFS de pinza débil y TRMFS de doble pinza débil, así como también los relacionados con la caracterización de las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. Estos resultados, presentados a continuación, fueron obtenidos de acuerdo a los montajes, experimentos y procedimientos de los capítulos 3 y 4.

### 5.1. TRMFS de pinza única en régimen de baja potencia y estudio de efectos protectores del resveratrol en membrana de glóbulos rojos

La herramienta de TRMFS de pinza única operando en régimen de baja potencia, fue utilizada para estudiar los efectos protectores del resveratrol sobre los glóbulos rojos, para lo cual, se midieron fluctuaciones de membrana y el parámetro mecánico denominado módulo de flexión  $\kappa$ . Los resultados de tales mediciones son presentados a continuación, complementando esta información con un breve análisis acerca de lo que estos significan.

#### 5.1.1. Amplitudes de fluctuación y parámetros mecánicos

Las fluctuaciones de glóbulos rojos fueron determinadas de manera de conocer el mecanismo mediante el cual el resveratrol actúa como un agente antioxidante a nivel de la membrana celular compuesta por una bicapa lipídica. Por su parte, las características mecánicas de la membrana también son muy importantes debido a que estas permiten que los glóbulos normales experimenten grandes cambios en su morfología, facilitando su paso a través de capilares de forma reversible. Para realizar estas mediciones se utilizó la herramienta de TRMFS de un haz en régimen de baja potencia para no ejercer fuerzas de atrapamiento.

Para asegurarse de la correcta implementación de la técnica, primero se realizó una validación de los valores experimentales obtenidos. Para esto, se determinó la fluctuación

media de la membrana de  $N = 100$  glóbulos rojos extraídos desde un paciente sano. Esta condición es denominada Control. Los valores de fluctuación obtenidos experimentalmente para esta condición son presentados en la tabla 5.1, y a la vez, son comparados con los valores de fluctuación de membrana de glóbulos rojos sanos obtenidos en otros trabajos basados en técnicas ópticas.

STD (nm)	$N$	Técnica	Referencia
$28.6 \pm 2.9$	100	TRMFS	Este trabajo
$33.0 \pm 1.3$	21	TRMFS	[31]
$23.6 \pm 0.6$	94	Procesamiento de Video	[187]
$30 \pm 5$	-	Procesamiento de Video	[133]
$39.6 \pm 6.8$	16	BFPI	[50]
$36.3 \pm 12$	-	Teórico	[31]

Tabla 5.1: Tabla comparativa de fluctuaciones de glóbulos rojos sanos en condición control obtenidas en diferentes trabajos. Para cada caso,  $N$  representa la cantidad de muestras usadas para la determinación del valor de fluctuación. Las técnicas comparadas corresponden a la espectroscopía de fluctuación de membrana (TRMFS), detección de fluctuaciones por videomicroscopía y a la interferometría de plano focal trasero (BFPI). Todas ellas se basan en principios ópticos. Además de los valores experimentales obtenidos en los diferentes trabajos, se ha incluido un valor teórico de fluctuación. Tabla de elaboración propia.

La tabla 5.1 muestra los valores de fluctuación de membrana de glóbulos rojos en la condición Control obtenidos en este trabajo y en otros que utilizan técnicas ópticas. La STD, representa la fluctuación promedio de  $N$  glóbulos medidos para la condición Control. En particular, en este trabajo se midieron las fluctuaciones de  $N = 100$  glóbulos, y el tratamiento estadístico de sus señales temporales para determinar una fluctuación media es presentada en detalle en la sección 4.6. Por su parte, el error con que es presentada la fluctuación media corresponde a la STD de los valores de fluctuación determinados para los  $N$  glóbulos (fluctuación media  $\pm$  STD). En relación a los valores obtenidos para este trabajo, y de acuerdo a los datos presentados en la tabla 5.1, la fluctuación media obtenida en la condición Control, es del orden de los 28.6 nm con un error entorno a los  $\sim 3$  nm. El valor de fluctuación encontrado en este trabajo para la condición Control es similar a los determinados en otros trabajos basados tanto en videomicroscopía como en la misma técnica usada en este trabajo. Por su parte, el error de la medición en este trabajo se encuentra en el orden de los presentados en otros que utilizan la misma técnica.

Por su parte, para el estudio de los efectos protectores del RV sobre los glóbulos rojos, se midieron y compararon las fluctuaciones medias de los glóbulos rojos expuestos a cuatro diferentes condiciones. Concretamente, los glóbulos fueron expuestos a un ambiente Control, uno donde existe presencia sólo de HClO (0.2 mM), otro en donde existe sólo

presencia de RV ( $20 \mu\text{M}$ ), y finalmente, uno en donde los glóbulos fueron incubados en RV y luego expuestos a la presencia de HClO. Los detalles de los protocolos de preparación de las muestras para cada una de las condiciones son detalladas en 4.4.1. Los resultados obtenidos para las cuatro condiciones, son presentados en la figura 5.1, en donde las fluctuaciones medias para cada caso, son representadas por la STD promedio extraída de las señales de fluctuación de  $N$  glóbulos medidos para cada condición.

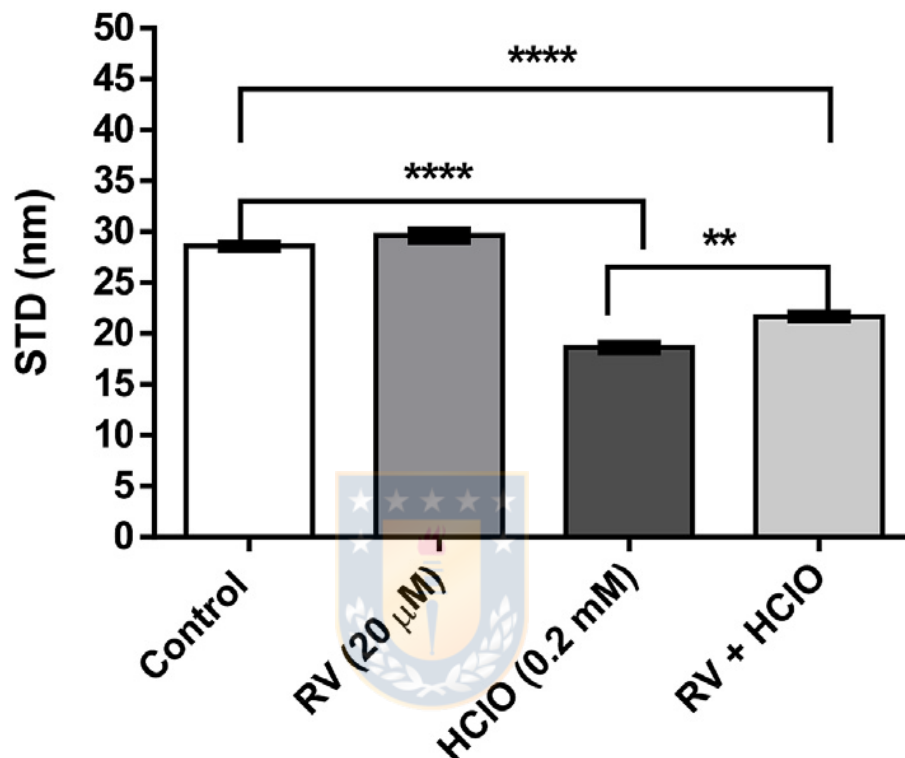


Figura 5.1: Valores de STD que representan fluctuación promedio de los glóbulos rojos para cuatro condiciones distintas, en donde en cada una de ellas, un total de  $N$  glóbulos fueron medidos. La primera condición corresponde a glóbulos rojos sanos expuestos a condiciones normales (Control,  $N = 100$ ), y las otras, a cuando son expuestos a  $20 \mu\text{M}$  de resveratrol (RV,  $N = 20$ ), a  $0.2 \text{ mM}$  de ácido hipocloroso (HClO,  $N = 20$ ) y a un ambiente en donde son preincubados con resveratrol y luego expuestos a HClO (RV+HClO,  $N = 20$ ). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante una prueba Tukey protegida. Los valores de confianza  $P$  (probabilidad de diferencia entre grupos) calculados, son presentados de manera que los  $P$  desde 0.001 hasta 0.01, correspondientes a valores de 99 %, son indicados con (\*\*). Por su parte, los  $P < 0.0001$ , correspondientes a valores  $> 99.9 \%$ , son indicados con (\*\*\*\*). La significancia estadística se definió como  $P < 0.01$ . Imagen de elaboración propia.

El gráfico de barras de la figura 5.1 muestra las STDs promedio correspondientes a las fluctuaciones medias de los glóbulos rojos expuestos a cuatro diferentes condiciones. En cada una de ellas, se midieron  $N$  glóbulos rojos. Las barras de errores de las fluctuaciones medias corresponden a la STD de los valores de fluctuación determinados para los  $N$

glóbulos medidos en cada condición. Además, en la figura 5.1 son presentados los valores de confianza  $P$  (probabilidad de diferencia entre grupos) calculados. Los  $P$  desde 0.001 hasta 0.01, correspondientes a valores de 99 %, son indicados con (\*\*). Por su parte, los  $P < 0.0001$ , correspondientes a valores  $> 99.9$  %, son indicados con (\*\*\*\*). La significancia estadística se definió como  $P < 0.01$ .

Los resultados de fluctuación mostrados en la figura 5.1 indican que no hay diferencia significativa entre las fluctuaciones medias de los glóbulos rojos de la condición Control respecto a los de la condición RV, en donde estos fueron preincubados con resveratrol. Lo anterior, indica que no hay efectos significativos del RV sobre la membrana cuando comparamos ambas condiciones. En contraste, el gráfico muestra que las fluctuaciones de los glóbulos disminuyen de manera significativa respecto al control cuando son expuestos a la condición de 0.2 mM de HClO y a la de RV + HClO, en donde para ambos casos, esta disminución de fluctuación se da con un nivel de significancia estadística de  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). Al mismo tiempo, existen diferencias estadísticas significativas entre la condición de exposición HClO con respecto a la de RV + HClO, la cual se da con una significancia estadística de  $P < 0.01$  (\*\*). La existencia de un mayor valor de fluctuación para la condición RV + HClO que para la exposición de los glóbulos solamente a HClO, indica un efecto protector del RV sobre la membrana. Dicho de otra manera, el RV estaría protegiendo a la membrana de los glóbulos rojos de los efectos oxidativos producidos por el HClO.

Para poder determinar propiedades mecánicas y físicas asociadas a cada una de las cuatro condiciones, se realizó un análisis a partir de las PSDs extraídas de las señales de fluctuación. Para conseguir lo anterior, se ajustó el modelo de membrana para frecuencias altas (ecuación 2.33) sobre la PSD media de cada uno de los  $N$  glóbulos medidos de una condición. Esto permitió extraer para cada glóbulo un valor de módulo de flexión de membrana  $\kappa$  y de viscosidad efectiva del medio  $\eta_{\text{eff}}$ . Así, se promediaron los  $N$  valores de estos parámetros para una condición dada y se obtuvieron los valores medios del módulo de flexión de membrana  $\kappa$  y de la viscosidad efectiva del medio  $\eta_{\text{eff}}$  representativos de las condiciones de Control, RV, HClO, y RV+ HClO. Mediante la tabla 5.2, se presenta un resumen general de los resultados de fluctuaciones,  $\kappa$  y  $\eta_{\text{eff}}$  obtenidos para cada condición. En esta tabla las fluctuaciones medias son indicadas nuevamente como STD en donde su error corresponde a la STD de los valores de fluctuación determinados para los  $N$  glóbulos (fluctuación media  $\pm$  STD). Por su parte, los valores medios de  $\kappa$  y de  $\eta_{\text{eff}}$  son presentados con un error que corresponde al SEM (valor medio  $\pm$  SEM), en donde SEM es el error estándar.

Los resultados mostrados en la tabla 5.2 muestran de manera explícita los valores de fluctuación media de los glóbulos rojos para cuatro diferentes condiciones a los que fueron expuesto. Además, para cada uno de los casos, se muestran los valores del módulo de flexión de membrana  $\kappa$  y la viscosidad efectiva  $\eta_{\text{eff}}$ . Esta última corresponde al valor medio entre la viscosidad dentro y fuera del glóbulo y no muestra diferencias significativas o notables entre los resultados cuando comparamos las diferentes condiciones. Por otro lado, los valores de los módulos de flexión  $\kappa$  mostraron variaciones interesantes respecto al valor



	Control	HClO	RV	RV + HClO
STD (nm)	$28.6 \pm 2.6$	$18.6 \pm 1.7$	$29.6 \pm 2.5$	$21.7 \pm 1.4$
$\kappa$ ( $10^{-19}$ J)	$2.2 \pm 0.4$	$3.6 \pm 0.5$	$1.2 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.6$
$\eta_{\text{eff}}$ ( $10^{-3}$ Pa $\times$ s)	$86.3 \pm 0.8$	$85.1 \pm 0.9$	$85.9 \pm 1.0$	$83.1 \pm 1.1$

Tabla 5.2: Parámetros mecánicos de los glóbulos rojos para diferentes condiciones a los que fueron expuestos. Se muestra la STD o fluctuaciones como también el módulo de flexión de membrana  $\kappa$  para cada caso. Las condiciones presentadas son glóbulos rojos normales (Control,  $N = 100$ ), glóbulos con 20  $\mu\text{M}$  de resveratrol (RV,  $N = 20$ ), glóbulos con 0.2 mM de HClO (HClO,  $N = 20$ ) y glóbulos preincubados con resveratrol y luego expuestos a 0.2 mM of HClO (RV + HClO,  $N = 20$ ).

del Control. El valor de  $\kappa$ , para la condición RV, es menor que para la condición control. Esto indicaría una mayor flexibilidad o menor rigidez de los glóbulos al ser incubados en RV respecto al Control, incluso cuando sus fluctuaciones no fueron significativamente diferentes. Para HClO, el valor de  $\kappa$  es más alto que para el Control, y fue el de valor más alto entre todas las condiciones. Esto indicaría una mayor rigidez, y por lo tanto, una menor fluctuación respecto a todos los otros casos, tal como lo reflejan los valores. Por último, cuando los RBCs se incubaron previamente con RV y luego se incorporó la misma cantidad de HClO, la rigidez no disminuyó tanto como en el caso de HClO, lo que indicaría un efecto protector del RV sobre la membrana de los glóbulos rojos cuando estos son expuestos a moléculas oxidativas.

## 5.2. Discusión de resultados para TRMFS de pinza única en régimen de baja potencia

De acuerdo a trabajos anteriores acerca de los efectos del RV sobre las bicapas lipídicas [122, 188, 189], sus efectos protectores o antioxidantes en glóbulos rojos se explican por el hecho de que, a bajas concentraciones, esta molécula se intercala en la membrana. Así, la caída del módulo de flexión que se produce a 20  $\mu\text{M}$  de RV se puede deber al hecho de que a esta concentración las moléculas de RV tienden a ubicarse en los grupos polares de la membrana [188]. De acuerdo a Neves et al. [189], esto se relaciona con un aumento de la fluidez de la membrana, disminuyendo su viscosidad y como consecuencia, disminuyendo también su módulo de flexión. Por otro lado, cuando los glóbulos son expuestos a HClO se alcanza la fluctuación de membrana de menor amplitud, lo que puede ser asociado a una mayor rigidez o menor capacidad de flexión de la membrana. La intercalación de moléculas de HClO dentro de la bicapa lipídica puede estar asociada a este comportamiento. De esta manera, la incubación de los glóbulos rojos en RV podría estar produciendo un efecto protector debido a que evitaría que las moléculas de HClO se intercalen en las zonas donde ya se encuentran las de RV. Por otro lado, las condiciones de fluidez iniciales de la membrana de los glóbulos rojos pueden tener implicancias al momento de interactuar

con el RV [190]. Si la membrana tiene una alta organización inicial, las moléculas de RV tenderían a intercalarse superficialmente. Por el contrario, si la fluidez de la membrana es mayor antes de la interacción, lo que equivale a una mayor desorganización estructural, las moléculas de RV tenderían a intercalarse más fácilmente entre la bicapa lipídica que conforma la membrana, y por lo tanto, causaría mayor rigidez. Un factor que puede contribuir a la mayor o menor organización estructural es la temperatura a la que se encuentra la membrana [190].

### 5.3. TRMFS de doble pinza en régimen de baja potencia y estudio de efectos de la glucosa sobre la membrana de glóbulos rojos

La herramienta de TRMFS de doble pinza operando en régimen de baja potencia, fue utilizada para estudiar los efectos de la D-glucosa sobre los glóbulos rojos. Para esto, se midieron fluctuaciones de membrana y, a partir de estas, se obtuvieron parámetros mecánicos tales como el módulo de flexión  $\kappa$  y la tensión  $\sigma$ . Los resultados de tales mediciones son presentadas a continuación, complementando esta información con un breve análisis acerca de lo que estos significan.

#### 5.3.1. Amplitudes de fluctuación y parámetros mecánicos

Para estudiar los efectos de la D-glucosa sobre las fluctuaciones y los parámetros mecánicos de la membrana de los glóbulos rojos, tres concentraciones diferentes de D-glucosa fueron usadas: 5.5 mM considerada como la condición Control, y 12.5 con 25 mM como ambientes de hiperglicemia. Los protocolos de preparación de las muestras para todas las concentraciones es detallado en 4.4.2. Por su parte, los datos fueron obtenidos simultáneamente desde dos posiciones diferentes de la membrana mediante los haces de medición  $S_{|H}$  y  $S_{|V}$ , los cuales, tienen polarización horizontal y vertical, respectivamente. Estos haces están posicionados en el perímetro de la membrana y están distanciados por el diámetro del glóbulo rojo. Para cada concentración, se midieron las fluctuaciones de  $N$  glóbulos rojos independientes adquiriendo, para cada uno de ellos, 20 archivos de 10 segundos a una tasa de adquisición de 20 kHz. Estas características de adquisición son válidas para ambos haces de medición. Por su parte, el número de glóbulos rojos examinados para 5.5, 12.5 y 25 mM de D-glucosa, fueron de  $N = 103$ ,  $N = 61$  y  $N = 47$ , respectivamente. Este número de glóbulos examinados fue definido luego de aplicar un método para la detección de valores atípicos (consideración de valores en el rango intercaartil) sobre los valores de amplitud de fluctuación media para cada concentración. Como caso puntual en el análisis, el módulo de flexión  $\kappa$  para 5.5 mM fue calculado, para ambos haces de medición, con  $N = 102$  glóbulos rojos debido a que, en uno de ellos, este parámetro no se pudo ajustar correctamente (valor de ajuste igual a límite de referencia). Es así que, a partir de los archivos de fluctuación medidos para cada concentración, y de la aplicación del tratamiento estadístico y análisis de sus PSDs detallado en la sección 4.6.2, se calculó

la amplitud media de fluctuación de los glóbulos rojos, el módulo de flexión  $\kappa$  y la tensión  $\sigma$  para cada concentración de D-glucosa. El resultado de los valores obtenidos para cada uno de los casos son mostrados en los gráficos de la figura 5.2 y presentados de manera explícita en la tabla 5.3.

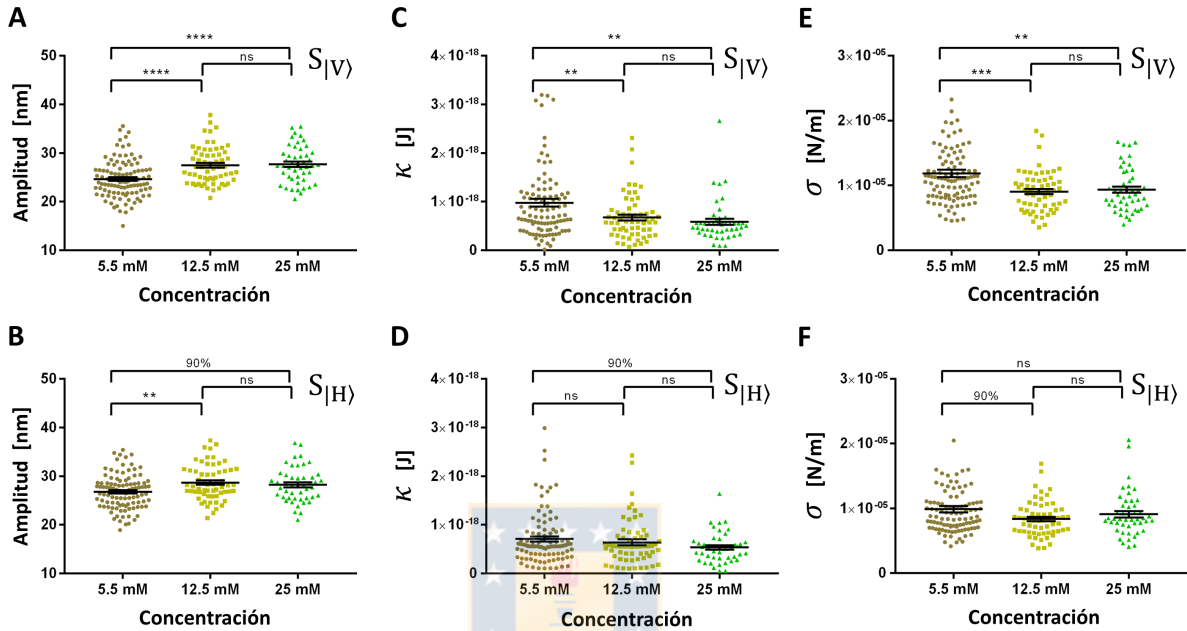


Figura 5.2: Amplitudes de fluctuación y determinación de parámetros mecánicos de glóbulos rojos expuestos a diferentes concentraciones de D-glucosa (5.5, 12.5 y 25 mM). **A-B** Distribución de la amplitud de fluctuación, **C-D** distribución de los módulos de flexión  $\kappa$  y **E-F** distribución de los valores de tensión  $\sigma$  de membrana asociados a los haces de medición  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ . En cada uno de los gráficos mostrados, desde **A** hasta **F**, se indican los valores de confianza  $P$  (probabilidad de diferencia entre grupos) obtenidos mediante un test ANOVA de una vía y un test Tukey. Valores de  $P$  entre 0.05 y 0.1 corresponden a 90%. Por su parte, valores de  $P$  desde 0.001 hasta 0.01 corresponden a 99% y son indicados con (\*\*). Valores de  $P$  entre 0.0001 y 0.001 corresponden a 99.9% y son indicados con (\*\*\*). Finalmente, los  $P < 0.0001$ , correspondientes a valores  $> 99.9\%$ , son indicados con (\*\*\*\*), y ns indica *sin significancia* (no hay diferencia entre grupos). Imagen de elaboración propia.

Los gráficos de la figura 5.2 y la tabla 5.3 resumen los resultados obtenidos para glóbulos rojos expuestos a diferentes concentraciones de D-glucosa usando TRMFS de doble haz. Estos corresponden al valor medio de los parámetros medidos junto a sus errores estándar (SEM). Para el Control (5.5 mM), los valores de amplitud de fluctuación fueron  $24.66 \pm 0.38$  nm y  $26.81 \pm 0.35$  nm para los haces  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ , respectivamente. Desde 5.5 mM a 12.5 mM, las amplitudes se incrementaron 11.5% y 7% para  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ , respectivamente. Por su parte, desde 12.5 mM a 25 mM, no hubo diferencia significativa para  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$  (ver tabla 5.3 y figura 5.2A y B). Por otro lado, el módulo de flexión  $\kappa$  (tabla 5.3 y figuras 5.2C

Señal	Parámetro	5.5 mM	12.5 mM	25 mM
$S_{ V\rangle}$	Amplitud (nm)	$24.66 \pm 0.38$	$27.50 \pm 0.49$	$27.68 \pm 0.55$
	$\kappa$ ( $10^{-19}$ J)	$9.79 \pm 0.78$	$6.75 \pm 0.59$	$5.87 \pm 0.63$
	$\sigma$ ( $10^{-6}$ N/m)	$11.85 \pm 0.55$	$9.05 \pm 0.39$	$9.35 \pm 0.50$
$S_{ H\rangle}$	Amplitud (nm)	$26.81 \pm 0.35$	$28.69 \pm 0.46$	$28.25 \pm 0.52$
	$\kappa$ ( $10^{-19}$ J)	$7.07 \pm 0.52$	$6.40 \pm 0.61$	$5.33 \pm 0.44$
	$\sigma$ ( $10^{-6}$ N/m)	$9.89 \pm 0.51$	$8.36 \pm 0.39$	$9.11 \pm 0.50$

Tabla 5.3: Comparación de los promedios de fluctuaciones y parámetros mecánicos para los haces de medición  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  en tres concentraciones de D-glucosa. Los valores medios son presentados con sus respectivos errores estándar (SEM).

y D) disminuyó 31 % para  $S_{|V\rangle}$  y 9.5 % para  $S_{|H\rangle}$  desde 5.5 mM a 12.5 mM. Desde 12.5 mM a 25 mM de D-glucosa, el módulo  $\kappa$  no mostró una diferencia significativa en  $S_{|V\rangle}$  y tampoco para  $S_{|H\rangle}$ . Desde 5.5 mM a 25 mM, el módulo de flexión  $\kappa$  mostró la diferencia más grande para ambos haces,  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$ . El otro parámetro mecánico determinado fue la tensión de membrana  $\sigma$ . Los valores de  $\sigma$  (tabla 5.3 y figuras 5.2E y F) disminuyeron aproximadamente 24 % y 15.5 % para  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$ , respectivamente, cuando la concentración de D-glucosa cambió desde 5.5 mM a 12.5 mM. Desde 12.5 mM a 25 mM, no se observaron cambios significativos para los casos de  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$ . Desde 5.5 mM a 25 mM, este parámetro mostró diferencias significativas solamente para  $S_{|V\rangle}$ . Para  $S_{|H\rangle}$ , el valor de  $\sigma$  se recuperó parcialmente a un valor similar al que tenía a 5.5 mM. Los valores de confianza  $P$  ( $P$ -values), que indican la probabilidad de que exista diferencia entre grupos, fueron calculados mediante un test ANOVA de una vía (one-way ANOVA) y un test Tukey sin definir una significancia estadística previa. Estos valores son presentados en cada uno de los gráficos de la figura 5.2. La tabla 5.4, resume estos valores de confianza  $P$  entre concentraciones para las mediciones realizadas mediante  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  de la amplitud de fluctuación, el módulo de flexión  $\kappa$  y tensión  $\sigma$ . Para la figura 5.2, se debe considerar que los valores de  $P$  entre 0.05 y 0.1 corresponden a 90 %. Por su parte, valores de  $P$  desde 0.001 hasta 0.01 corresponden a 99 % y son indicados con (\*\*). Valores de  $P$  entre 0.0001 y 0.001 corresponden a 99.9 % y son indicados con (\*\*\*). Finalmente, los  $P < 0.0001$ , correspondientes a valores  $> 99.9\%$ , son indicados con (\*\*\*\*), y ns indica *sin significancia* (no hay diferencia entre grupos).

Señal	Valor $P$ para	5.5 vs 12.5 mM	5.5 vs 25 mM	12.5 vs 25 mM
$S_{ V\rangle}$	Amplitud	< 0.0001	< 0.0001	0.9692
	$\kappa$	0.0099	0.0017	0.7591
	$\sigma$	0.0006	0.0059	0.9418
$S_{ H\rangle}$	Amplitud	0.0035	0.0582	0.7978
	$\kappa$	0.6476	0.0912	0.4719
	$\sigma$	0.0633	0.5433	0.6236

Tabla 5.4: Valores  $P$  obtenidos mediante test ANOVA para el análisis estadístico de las fluctuaciones y parámetros mecánicos de glóbulos rojos expuestos a diferentes condiciones de D-glucosa. Los valores  $P$  son mostrados tanto para las mediciones asociadas a  $S_{|V\rangle}$  como a  $S_{|H\rangle}$ . Tabla de Elaboración propia.

### 5.3.2. Correlación de parámetros medios

Se calculó la correlación de Pearson entre los parámetros medios de la membrana (Amplitud de fluctuación,  $\kappa$  y  $\sigma$ ) obtenidos para  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  para cada concentración. Esto fue realizado para evaluar la simetría de los glóbulos rojos en términos de la fluctuación y parámetros mecánicos. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 5.5.

Parámetro	Amplitud			$\kappa$			$\sigma$		
	5.5	12.5	25	5.5	12.5	25	5.5	12.5	25
Concentración (mM)									
Correlación de Pearson	0.433	0.456	0.599	0.625	0.474	0.358	0.795	0.526	0.802

Tabla 5.5: Correlación de Pearson entre los parámetros medios de la membrana (Amplitud de fluctuación,  $\kappa$  y  $\sigma$ ) obtenidos para  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  para cada concentración.

Los valores de correlación de Pearson varían entre -1 y 1, donde -1 es una correlación negativa perfecta, 0 es una correlación nula, y +1 es una correlación positiva perfecta. Considerando esta graduación, se obtuvieron valores de correlación positivos de grado moderado a alto para los diferentes parámetros (Amplitud de fluctuación,  $\kappa$  y  $\sigma$ ) a diferentes concentraciones, tal como lo muestra la tabla 5.5. Por propósitos académicos, los valores de tensión en función del número del glóbulo medido son mostrados para los haces  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  en la figura 5.3. En particular, para una concentración de 25 mM, el gráfico de la figura 5.3 muestra la variación de los valores medios de tensión entre los diferentes glóbulos medidos para ambos haces de medición ( $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$ ). El comportamiento de estas curvas muestra una cierta homogeneidad de la tensión de membrana de los glóbulos rojos al medir en dos puntos separados por su diámetro. Esto está en concordancia con los valores de correlación de Pearson mostrados en la tabla 5.5.

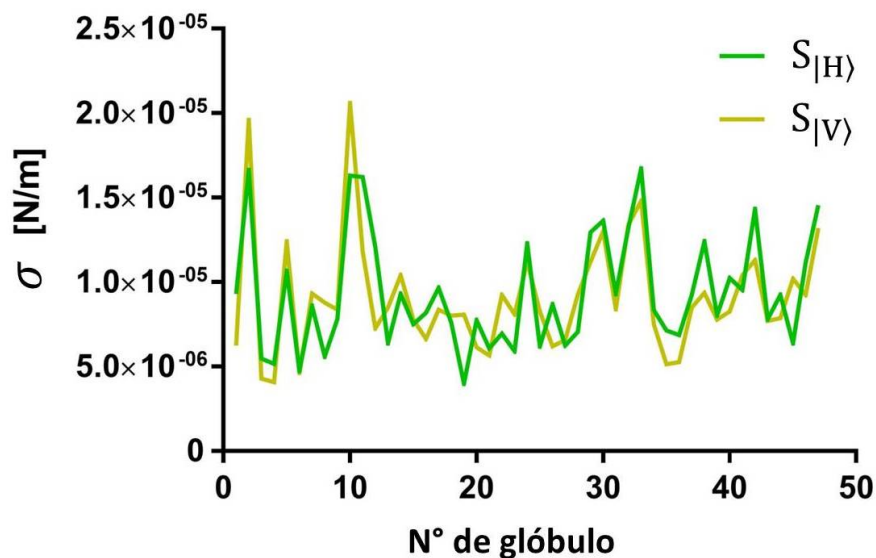


Figura 5.3: Valores de tensión  $\sigma$  promedio de cada uno de los  $N$  glóbulos medidos a una concentración de 25 mM de D-glucosa son mostrados simultáneamente para los haces de medición  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$ . Imagen de elaboración propia.

### 5.3.3. Correlación entre señales

Se calcularon las correlaciones de Pearson entre las señales temporales de  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  para cada uno de los  $N$  glóbulos de una concentración determinada. Para las señales temporales, se seleccionaron ventanas de tiempo de 0.01, 0.1, 1 y 10 segundos de manera de analizar las correlaciones a diferentes frecuencias (100, 10, 1 y 0.1 Hz, respectivamente). A partir de esto, se obtuvo una correlación media para cada glóbulo rojo, y luego, el promedio de estos valores medios individuales. Esto se realizó para cada concentración. Los resultados de este análisis son presentados en la figura 5.4 y la tabla 5.6 en donde, las diferencias estadísticas entre estos grupos de datos, se determinaron mediante el análisis ANOVA y Tukey (Valores  $P$  en Apéndice A). De manera interesante, se encontró una correlación negativa (anticorrelación) moderada en los desplazamiento temporales de la membrana mientras más baja es la frecuencia analizada. Estas frecuencias se encuentran asociadas con las ventanas temporales más largas. Por el contrario, estas anticorrelaciones comienzan a desaparecer para frecuencias más altas, es decir, para análisis de ventanas de tiempo más cortas. Además, estas anticorrelaciones tienden a ser más fuertes con el incremento de la concentración de D-glucosa, alcanzando un plateau para las concentraciones de 12.5 y 25 mM de D-glucosa.

Los resultados indicados en la figura 5.4 y tabla 5.6, son complementados por la figura 5.5. Esta muestra el comportamiento de las señales  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  durante 10 segundos al medir fluctuaciones a concentraciones de 5.5, 12.5 y 25 mM de D-glucosa correspondientes a las figuras 5.5A, 5.5B y 5.5C, respectivamente. En estas figuras se pueden apreciar los movimientos contrarios de las señales  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  para todas las concentraciones durante



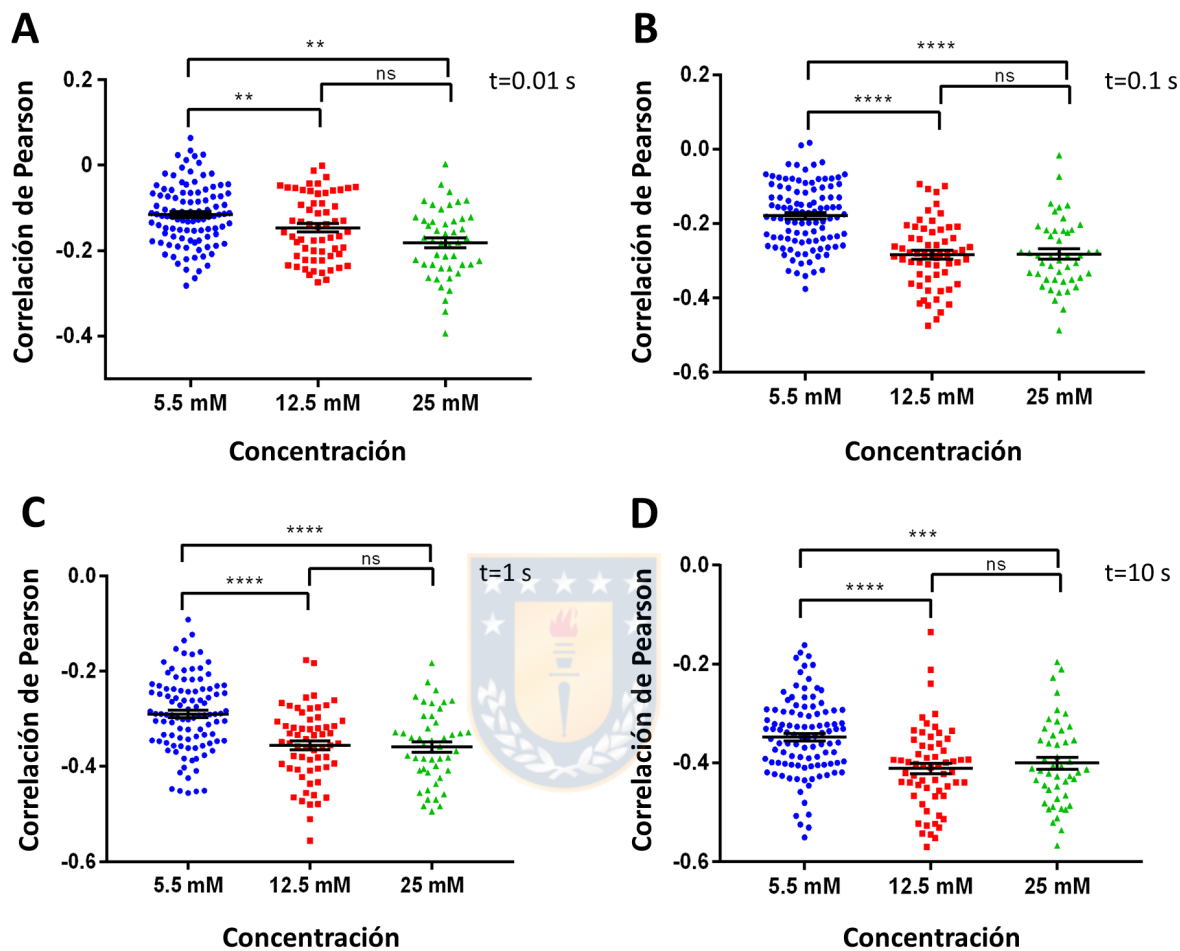


Figura 5.4: Valores promedio de la correlación de Pearson entre señales  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  para glóbulos rojos a diferentes concentraciones de D-glucosa. Para las señales analizadas, ventanas de tiempo de 0.01, 0.1, 1 y 10 s. fueron consideradas, las cuales, están asociadas a frecuencias de 100, 10, 1 y 0.1 Hz. Los valores  $P$  que indican las diferencias de poblaciones, fueron obtenidas mediante un test ANOVA y Tukey. Estos son indicados de forma que los valores de  $P$  desde 0.001 hasta 0.01 corresponden a 99% y son indicados con (\*\*). Valores de  $P$  entre 0.0001 y 0.001 corresponden a 99% y son indicados con (\*\*\*). Finalmente, los  $P < 0.0001$ , correspondientes a valores  $> 99.9\%$ , son indicados con (\*\*\*\*), y ns indica *sin significancia* (no hay diferencia entre grupos). Imagen de elaboración propia.

Ventana de tiempo (s)	Concentración (mM)	Correlación de Pearson
0.01	5.5	-0.116
	12.5	-0.147
	25	-0.182
0.1	5.5	-0.179
	12.5	-0.284
	25	-0.282
1	5.5	-0.289
	12.5	-0.356
	25	-0.356
10	5.5	-0.348
	12.5	-0.411
	25	-0.400

Tabla 5.6: Valores de correlación de Pearson promedio entre señales  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  para diferentes concentraciones de D-glucosa usando ventanas temporales de análisis de 0.01, 0.1, 1 y 10 segundos equivalentes a frecuencias de análisis de 100, 10, 1 y 0.1 Hz, respectivamente. Tabla de Elaboración propia.

un tiempo de 10 segundos. Este comportamiento observado muestra el origen de los valores promedio de anticorrelación de grado moderado obtenidos para el análisis de señales durante el mismo tiempo de 10 segundos.

Por otro lado, también se obtuvieron las correlaciones cruzadas entre las señales de amplitud de fluctuación  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  medidas simultáneamente durante un intervalo de 10 segundos. Este cálculo se realizó para dos glóbulos (independientes entre sí) de cada concentración, y los resultados, son mostrados para las concentraciones de 5.5, 12.5 y 25 mM en las figuras 5.6A, 5.6B y 5.6C, respectivamente. En todos los gráficos de la figura 5.6 las correlaciones son mostradas de manera normalizada, y complementariamente, se insertaron gráficos interiores para indicar las distribuciones de las señales  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  correlacionadas.

Los resultados indicados en la figura 5.6 muestran que, el comportamiento de la correlación cruzada para el intervalo de tiempo de 10 segundos, no es exactamente igual para dos glóbulos a la misma concentración y entre concentraciones. Esto puede ser observado comparando los gráficos de la derecha e izquierda de las figuras 5.6A, 5.6B y 5.6C y los gráficos a diferentes concentraciones. Los valores máximos de correlación cruzada para los dos glóbulos a una misma concentración también se muestran disímiles aunque esto parece acentuarse cuando comparamos entre concentraciones. Por otro lado, los comportamientos de las correlaciones cruzadas de las diferentes concentraciones parecen dar cuenta de que los máximos y mínimos valores se encuentran dentro de funciones con cierta periodicidad, que aunque no es igual para todos los casos, es del orden de los segundos. En este sentido,

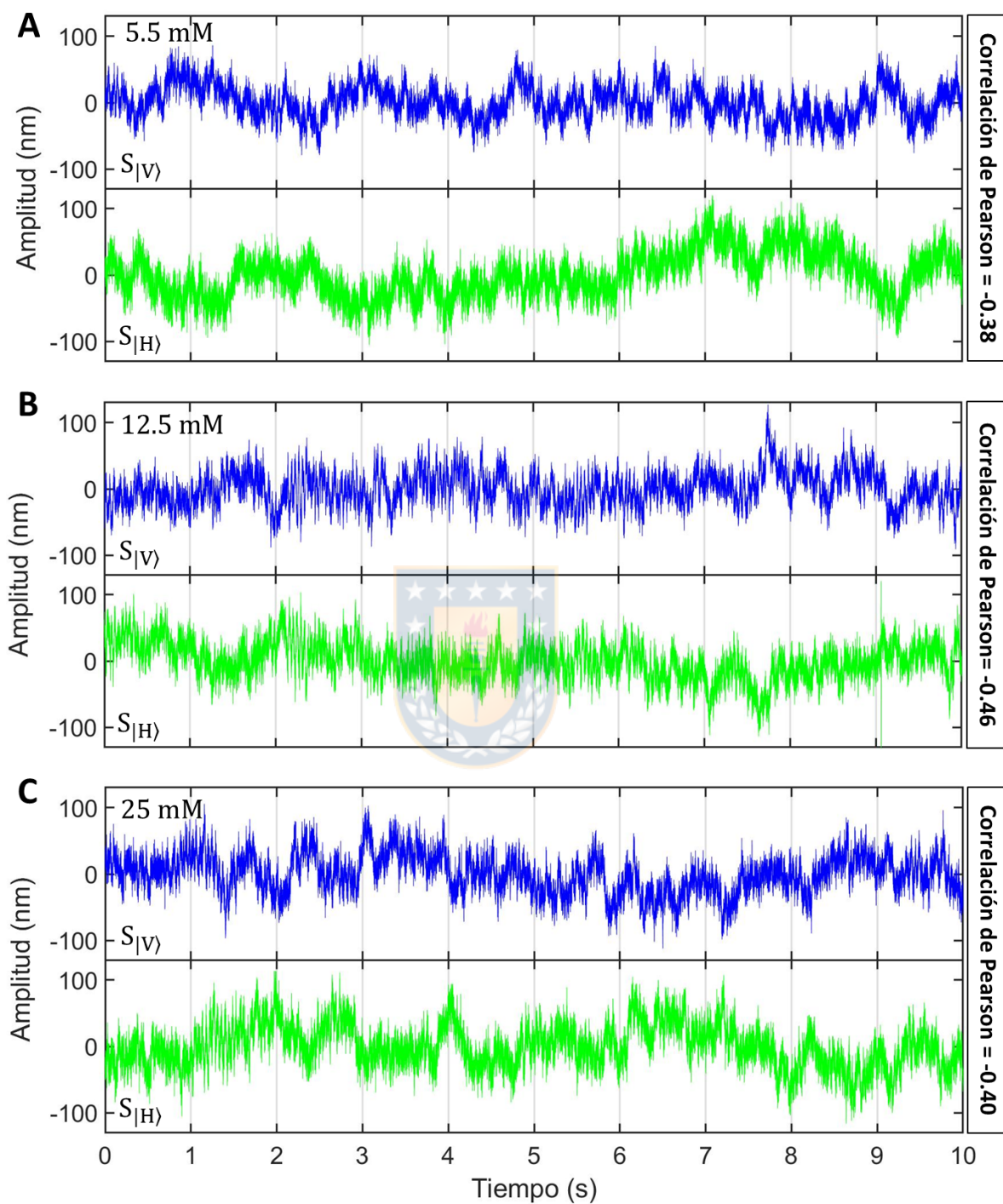


Figura 5.5: Señales de amplitud de fluctuación  $S_{|V\rangle}$  (Azul) y  $S_{|H\rangle}$  (Verde) de 10 segundos para concentraciones de 5.5 (A), 12.5 (B) y 25 mM (C) de D-glucosa con valores de anticorrelación de -0.38, -0.46 y -0.40. Imagen de elaboración propia.

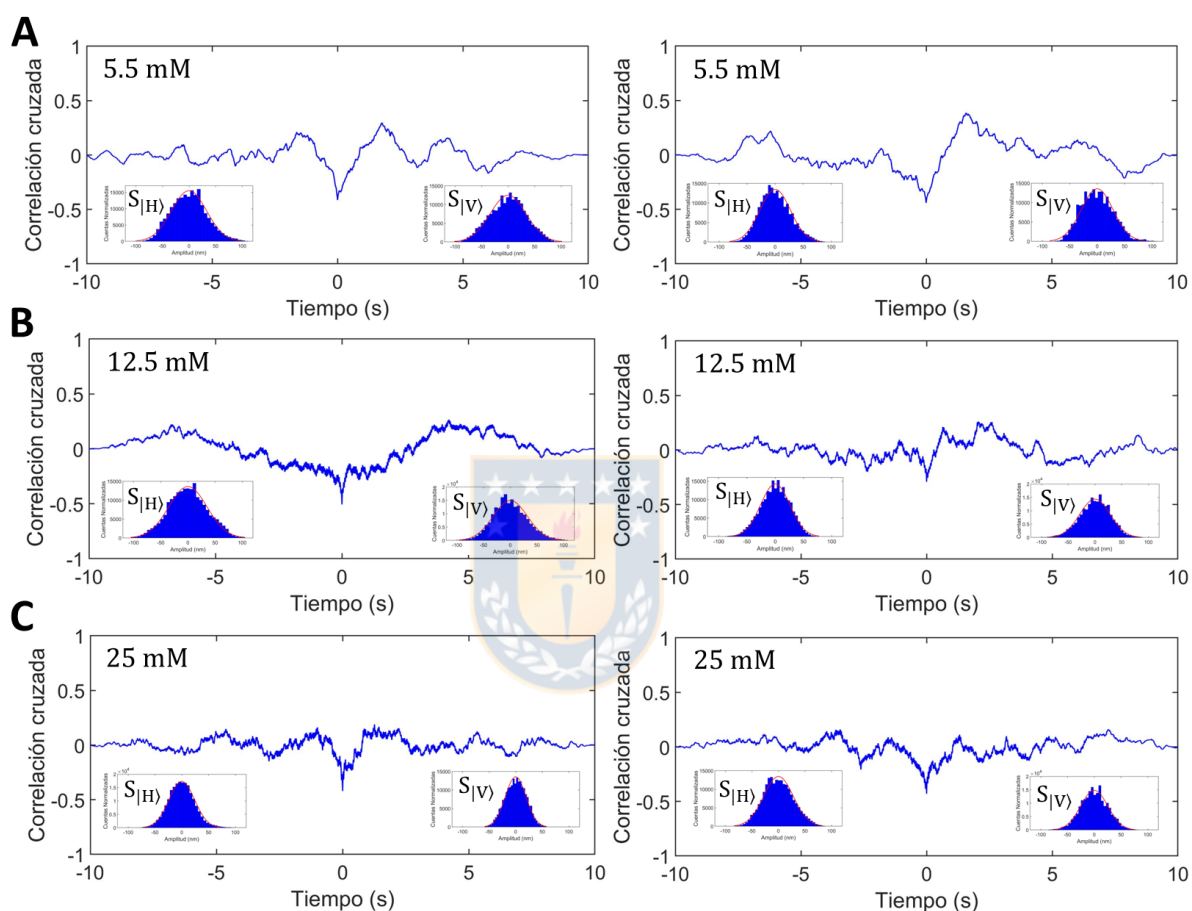


Figura 5.6: Correlaciones cruzadas entre señales  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$  de dos glóbulos independientes para las concentraciones de 5.5 (A), 12.5 (B) y 25 (C) mM. Los gráficos en (A), (B) y (C), contienen figuras interiores que dan cuenta de las distribuciones de las señales  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$  correlacionadas, las cuales, tienden a ser Gaussianas. Las correlaciones son presentadas de manera normalizada. Imagen de elaboración propia.

se debe observar también que estas funciones periódicas de correlación cruzada decaen a 0 en un intervalo de 10 segundos con una cierta función envolvente que se amortigua para este orden de tiempo. De acuerdo a estos resultados, se podría presumir que las señales  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  poseen correlaciones que fluctúan localmente y decaen globalmente en el tiempo para todas las concentraciones analizadas.

### 5.3.4. Determinación de la fluidez de membrana mediante polarización generalizada de Laurdan

Debido a que la técnica de TRMFS no permite acceder a todos los parámetros físicos de la membrana lipídica de los glóbulos rojos, se realizó un estudio complementario mediante la técnica de polarización generalizada de Laurdan (Laurdan generalized Polarization). Esta técnica permite obtener la fluidez de membrana usando imágenes de polarización generalizada (imágenes GP) y tinte fluorescente Laurdan [191]. En particular, Laurdan es una molécula fluorescente utilizada para detectar cambios en las propiedades de la fase de la membrana a través de su sensibilidad a la polaridad del medio ambiente en la bicapa [192]. Así, los cambios de polaridad se muestran mediante cambios en el espectro de emisión de Laurdan, que se cuantifican calculando la polarización generalizada (GP). La relación entre el valor de GP y la fluidez es inversa, es decir, mayores valores de GP implican menor fluidez y viceversa. Los detalles acerca de los fundamentos, implementación y procedimientos de esta técnica pueden ser revisados en Apéndice B. Para el análisis, sólo se consideraron glóbulos discoides sanos (eritrocitos). De acuerdo a la figura 5.7A, en las imágenes obtenidas solamente se consideró un anillo de 5 píxeles tomado desde el borde exterior al centro de los glóbulos rojos. Lo anterior, se hizo con la finalidad de minimizar la contribución de citoplasma en el análisis. Es importante hacer notar que el análisis no selecciona exclusivamente el plasma de la membrana ya que la resolución del método no permite tal precisión. El promedio de los valores del GP para cada concentración, es mostrada en la figura 5.7B. Además de la dispersión de los datos, son mostrados los valores medios de GP para cada concentración de D-glucosa. De esta manera, se observó un pequeño aumento significativo en el valor medio de GP para 12.5 mM en comparación con 5.5 mM, y también, se observó un plateau en el valor del GP entre 12.5 y 25 mM. Adicionalmente, se analizó el posible cambio en el tamaño de los glóbulos rojos en función de las diferentes concentraciones de D-glucosa utilizadas, lo cual se muestra en la figura 5.7C. Para esto, fueron considerados glóbulos rojos individuales ( $N = 112$  para cada concentración) desde las imágenes de intensidad para calcular sus tamaños. De esta manera, no se observaron cambios significativos en los radios entre las tres concentraciones, los cuales fueron,  $(3.69 \pm 0.04)$ ,  $(3.63 \pm 0.05)$  y  $(3.74 \pm 0.05)$   $\mu\text{m}$  para las incubaciones a 5.5, 12.5 y 25 mM D-glucosa, respectivamente. Es importante mencionar que las imágenes confocales utilizadas para el análisis de los tamaños fueron obtenidas en un plano  $z$  (en el centro de los glóbulos rojos). De esta forma, es posible que cambios leves del volumen en la dirección del eje axial puedan no ser detectados a medida que cambian las concentraciones.

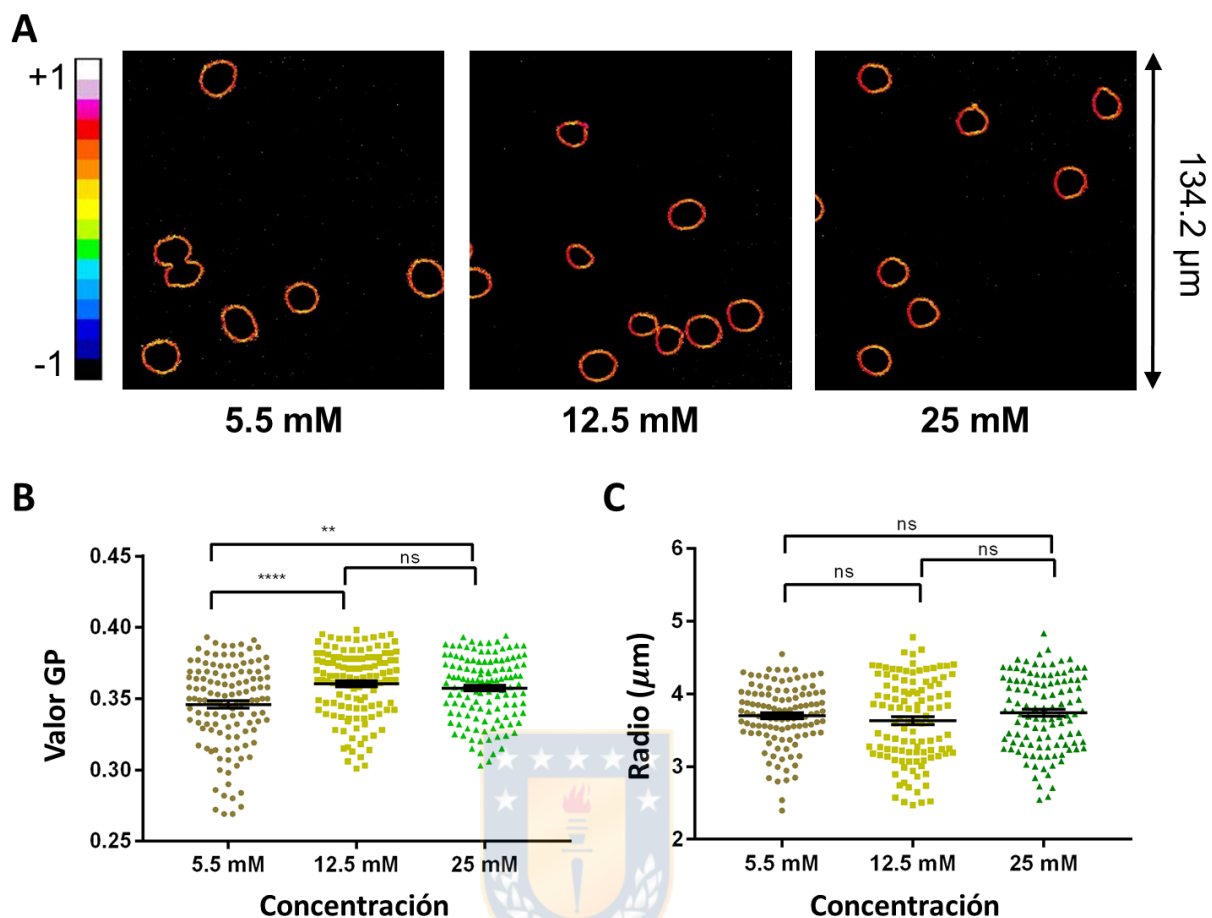


Figura 5.7: Medición de la fluidez de membrana mediante método Laurdan-GP. **A** Representación de las imágenes GP de Laurdan para las 3 concentraciones de D-glucosa. Una escala de color arbitrario es usada para el rango de los valores de GP entre -1 y 1. **B** Medición de la fluidez (valor de GP) para glóbulos rojos individuales en función de las tres concentraciones de D-glucosa tratadas, 5.5, 12.5 y 25 mM ( $N = 125$  glóbulos para cada concentración). **C** Radio de eritrocitos o glóbulos rojos sanos individuales en función de las concentraciones de D-glucosa ( $N = 112$  glóbulos para cada concentración). Mediante una prueba ANOVA, los siguientes parámetros fueron usados para los valores de confianza  $P$  ( $P$ -values): (\*\*)  $P = 0.001$  hasta 0.01, o 99%; (\*\*\*\*) es  $P < 0.0001$ , o  $> 99.9\%$ , y ns significa *sin significancia*.

#### 5.4. Evaluación de coordenada diferencial en TRMFS de doble pinza en régimen de baja potencia

La implementación de la técnica de TRMFS de doble haz entrega capacidades de adquisición y análisis superiores a la herramienta de TRMFS de haz único, y también, posee capacidades que la hacen equivalente a las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. En particular, si bien los haces  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  de TRMFS de doble haz no atrapan como en



pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, en ambos casos estos permiten adquirir el desplazamiento de un objeto de interés. Para el primer caso, se mide la posición de la membrana de un glóbulo rojo, y en el segundo caso, se mide el desplazamiento de una esfera que da cuenta del movimiento de un objeto biológico al cual está adherida. Es por esto que en ambos casos, las señales  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  poseen información de posición de los objetos de interés. Es desde esta analogía que, mediante la resta de las señales  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  usadas en TRMFS de doble haz, se construye de manera directa una señal o coordenada diferencial para evaluar posibles mejoras del SNR de esta señal respecto al de las señales individuales. La motivación de esta idea surge como un análogo a lo realizado en el trabajo de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte de Moffitt et al. [10], presentado teórica y conceptualmente en la sección 2.5.3. Estas pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, evalúan mejoras en el SNR de señales diferenciales considerando las correlaciones entre dos puntos de medición conectados físicamente por un ligando. En el caso de TRMFS de doble haz, los dos puntos de medición también están conectados por la membrana del glóbulo rojo y ciertos tipos de correlaciones pueden expresarse en mejoras de resolución al usar coordenadas diferenciales. Por lo anterior, es conveniente evaluar mejoras del SNR al usar una coordenada diferencial en un estudio conceptualmente equivalente al realizado en pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte como ya ha sido presentado (ver sección 2.5.3).

Para este análisis, se utilizan las señales de fluctuación de membrana de  $S_{|V)}$  y  $S_{|H)}$  adquiridas para la calibración. Estas fueron obtenidas mediante un barrido de voltaje en el rango de 0 – 150 V aplicando pasos de 2 V a los espejos piezoeléctricos que controlan la posición y desplazamiento de los haces en el plano de la muestra (ver sección 4.6.2). Así, para cada posición del haz o paso de voltaje, tanto para  $S_{|V)}$  como para  $S_{|H)}$ , se adquirió una señal de fluctuación de 1 (s) a 20 kHz. A partir de la resta de estas señales, y aplicando el valor absoluto a esta diferencia, puede ser extraída una señal diferencial  $S_{|diff)}$ . Usando esta información, se puede obtener el SNR de cada señal. Para esto, se debe calcular el valor absoluto de la resta entre las fluctuaciones promedio de dos pasos consecutivos, equivalente al tamaño del escalón entre ambos pasos, y luego, este resultado debe ser dividido por la STD de la señal de fluctuación del paso que fue adquirido primero temporalmente. Para observar los resultados de este análisis y sus detalles, se presenta la figura 5.8.

La figura 5.8A muestra la señal de calibración de  $S_{|V)}$  (Azul) y  $S_{|H)}$  (Roja), y también, la señal diferencial  $S_{|diff)}$  (Verde) construida a partir de las dos señales individuales de calibración ya mencionadas. Para esta figura, tanto  $S_{|V)}$  (Azul) como  $S_{|H)}$  fueron desplazadas levemente mediante una constante (offset) para situar sus orígenes en un voltaje cero. Estas señales fueron las utilizadas para la obtención de la señal diferencial y para los posteriores análisis de SNR. Cada señal de calibración presentada en la figura 5.8A es obtenida al realizar un barrido en el rango 0 – 150 V con pasos de 2 V desde afuera hacia adentro de un glóbulo a 12.5 mM de D-glucosa, lo cual, se realiza de derecha a izquierda para  $S_{|V)}$  y de izquierda a derecha para  $S_{|H)}$ . El barrido es equivalente a dar 75 pasos, los cuales, son representados en el eje horizontal. El eje vertical por su parte, entrega el valor de voltaje de las señales a medida que el barrido es realizado. Todas las señales muestran

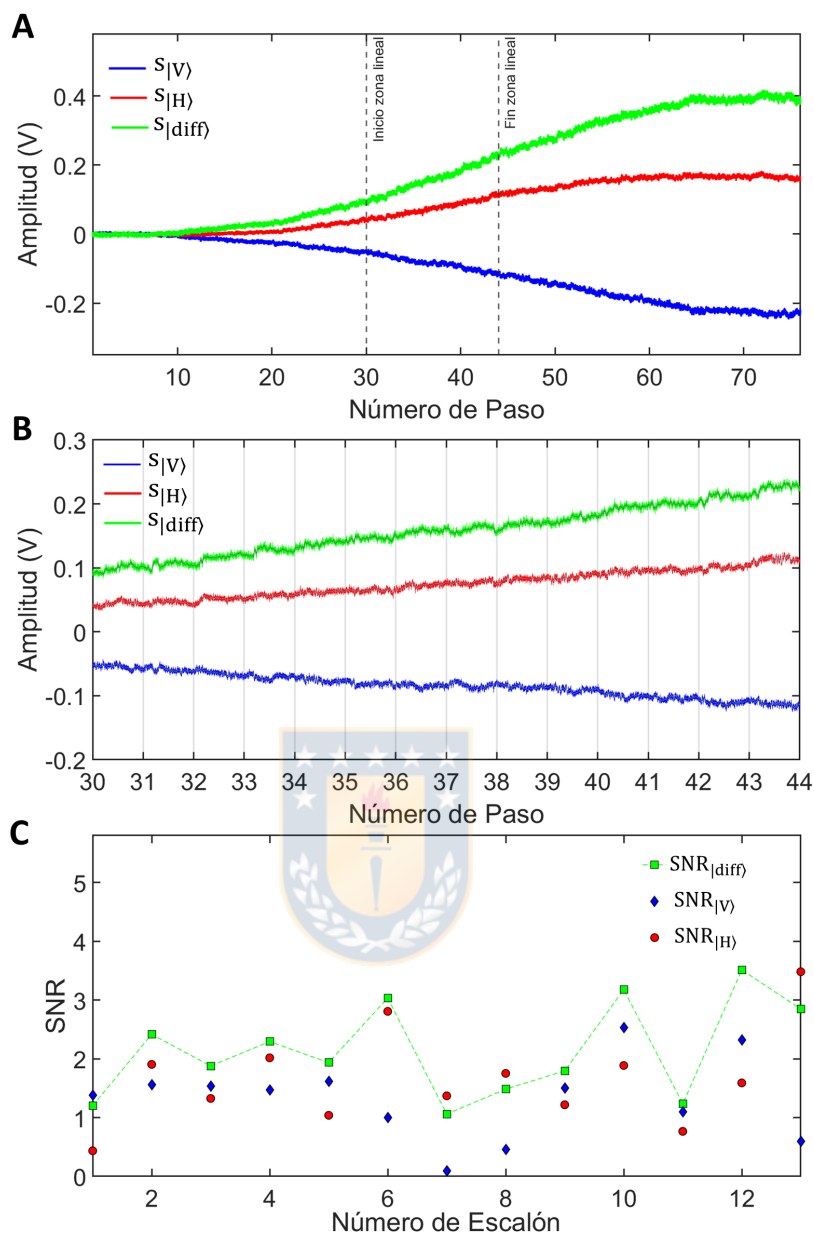


Figura 5.8: Análisis del SNR de las señales individuales de medición  $S_{|H}$  y  $S_{|V}$ , y de la señal diferencial  $S_{|diff}$  extraída desde ambas. **A** Señales individuales y diferencial obtenidas al realizar un barrido de calibración para cada haz desde 0 – 150 V con pasos de 2 V sobre un glóbulo a 12.5 mM. Esto es equivalente a dar 75 pasos (eje horizontal). **B** Sector en donde las zonas lineales de las tres señales coinciden temporalmente. Se pueden apreciar además los escalones que surgen al adquirir datos de fluctuación con los haces individuales en cada posición sobre la membrana del glóbulo rojo. **C** Valores de SNR calculados para las tres señales a partir de la proporción entre la diferencia de dos pasos consecutivos (escalón) y la dispersión de la señal de fluctuación (STD) de uno de los pasos, en donde,  $SNR_{|V}$ ,  $SNR_{|H}$  y  $SNR_{|diff}$ , son los valores asociados a las señales  $S_{|V}$ ,  $S_{|H}$ , y  $S_{|diff}$ , respectivamente. Imagen de elaboración propia.

una zona lineal de respuesta ante el desplazamiento de los haces. Las líneas punteadas indicadas como *Inicio de zona lineal* y *Fin de zona lineal*, marcan el intervalo de pasos seleccionado para el posterior análisis del SNR de las señales, y en donde los pasos de las tres zonas lineales dentro de este rango, coinciden temporalmente entre ellos. Un acercamiento a este intervalo es mostrado en la figura 5.8B. En esta figura se logran apreciar de mejor manera las señales de fluctuación para cada paso en las señales  $S_{|V}$  (Azul),  $S_{|H}$  (Roja), y la señal diferencial  $S_{|diff}$  (Verde). Es así que, entre cada paso, existirá un escalón, lo cual es válido para las tres señales presentadas en la figura 5.8B. El análisis de SNR es mostrado en la figura 5.8C para los escalones entre pasos indicados en la figura 5.8B de manera que  $SNR_{|V}$  (Azul) y  $SNR_{|H}$  (Rojo) corresponden a los valores de SNR calculados para las señales individuales  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ , respectivamente, y  $SNR_{|diff}$  (Verde) corresponde a los valores de SNR calculados para la señal diferencial  $S_{|diff}$ . Los valores de SNR sobre 1 indican que es posible diferenciar el cambio en la señal (escalón) entre dos pasos consecutivos respecto al ruido o STD de las señales de fluctuación de los pasos. Se puede observar que la mayoría de los valores de SNR de las señales individuales,  $S_{|V}$  (Azul) y  $S_{|H}$  (Roja), se encuentran sobre este valor, y que los valores de SNR para  $S_{|diff}$  (Verde), en la mayoría de los casos, son mayores a los de las señales individuales. En un número menor de casos, el valor del SNR de la señal  $S_{|diff}$  es mejor al SNR de sólo una de las señales individuales. Aún así, para todos los casos, la señal  $S_{|diff}$  muestra la capacidad de moderar los efectos del ruido.

## 5.5. Discusión de resultados para TRMFS de doble pinza en régimen de baja potencia

Debido a la variedad de resultados, la discusión es detallada en diferentes categorías independientes donde se discutirán los resultados.

### 5.5.1. Relación de la fluctuación y parámetros mecánicos de los glóbulos rojos con respecto a la glucosa y el ATP

La discusión de los resultados de fluctuación y parámetros mecánicos de los glóbulos rojos se basa en literatura existente que aborda las relaciones conocidas entre las concentraciones de D-glucosa y la disponibilidad de ATP en los glóbulos rojos.

Es bien sabido que la glicólisis es el principal mecanismo de síntesis de ATP en los glóbulos rojos [193]. Trabajos recientes han relacionado la disponibilidad de ATP con la preservación de la forma biconcava de los glóbulos rojos, las fluctuaciones fuera del equilibrio y la actividad de la red de espectrina de membrana [31, 131, 194]. Trabajos anteriores muestran que los glóbulos rojos incubados por 24 horas en un ambiente libre de glucosa, con y sin inhibición de producción de ATP, tienen fluctuaciones mucho más bajas que glóbulos rojos sanos (eritrocitos). Aún más, se ha mostrado un resurgimiento de la amplitud de fluctuación para glóbulos rojos sin disponibilidad de ATP en presencia de glucosa [194].

En el actual trabajo, se realizó una incubación de 24 horas bajo diferentes concentraciones extracelulares de D-glucosa, generando de esta manera, que los glóbulos rojos estudiados tuvieran ATP disponible debido a la glicólisis [193,194]. Los resultados ya presentados, muestran mayores fluctuaciones para 12.5 y 25 mM, en comparación con 5.5 mM (figuras 5.2A y 5.2B). Una hipótesis plausible podría ser la activación de procesos no homeostáticos debido a la posible disponibilidad adicional de ATP a medida que aumentan las concentraciones de D-glucosa. Viscupikova et al. determinaron que, a las 24 horas de incubación, incluso con 45 mM D-glucosa, no hay cambios en la glicosilación de la hemoglobina, las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , la eriptosis (apoptosis de los glóbulos rojos), o la síntesis de superóxido en comparación con la D-glucosa a 5 mM. Sólo una concentración muy alta (100 mM) de D-glucosa, y un mayor tiempo de incubación (48 o 72 horas), indujeron cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y el estrés oxidativo. Es importante destacar que, después de 24 horas de incubación, hay una disminución de la actividad de ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática y una mayor peroxidación lipídica, pero estos cambios son similares en los glóbulos rojos incubados con concentraciones de 5 mM de D-glucosa o mayores [195]. Además, la incubación de glóbulos rojos en D-glucosa entre 10 a 40 mM no tiene efectos sobre la viscosidad sanguínea, el hematocrito, la morfología y el volumen celular después de 1 a 24 horas de incubación [196]. De manera similar a nuestros resultados obtenidos mediante el uso de la técnica de polarización generalizada de Laurdan, y considerando sus capacidades resolutivas, la incubación con mayores concentraciones de D-glucosa no indujo ningún cambio en el radio de los glóbulos rojos después de 24 horas de incubación.

De acuerdo con estos antecedentes, y a los resultados obtenidos en este trabajo, es posible establecer dos ideas principales que pueden estar relacionadas. Primero, y a modo de ejemplo, si las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  permanecen sin cambios para diferentes concentraciones de D-glucosa a las 24 horas de incubación, la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  consume energía a una tasa constante, independiente del exceso de disponibilidad de ATP. Si esto es cierto, el sistema homeostático completo, encargado de mantener el equilibrio electroquímico de los glóbulos rojos, consume una cantidad constante de energía en este tiempo de incubación, independiente de la concentración inicial de D-glucosa (excluyendo concentraciones excesivamente altas).

En segundo lugar, en nuestro caso, el incremento de concentración de D-glucosa podría implicar que existe más producción de ATP mediante glicólisis anaeróbica. De esta manera, si la producción de ATP y las concentraciones iniciales de D-glucosa son proporcionales, podría existir más energía disponible para 12.5 mM y 25 mM que para 5.5 mM después de 24 horas de incubación. Considerando lo expuesto, ambas afirmaciones establecidas anteriormente podrían estar relacionadas porque ciertas cantidades de energía deberían usarse para procesos homeostáticos y otras para activar procesos no homeostáticos relacionados, por ejemplo, con la red de espectrina de la membrana de los glóbulos rojos. Este último tipo de proceso puede explicar el aumento de las fluctuaciones y la disminución de los parámetros mecánicos de los glóbulos rojos a medida que aumentan las concentraciones

de D-glucosa.

Según el modelo teórico de la red de membrana-espectrina [31], la tensión  $\sigma$  y el módulo de flexión  $\kappa$ , son parámetros efectivos de la membrana y la red de espectrina. Las moléculas de ATP rompen los enlaces membrana-espectrina a través de la fosforilación de la proteína 4.1R, la cual, ancla la membrana a la red de espectrina. Este es un proceso activo que aumenta la amplitud de fluctuación de la membrana con respecto al ruido browniano (térmico). Lo anterior, resulta en un desprendimiento parcial de la membrana, bajando los valores efectivos para la tensión y el módulo de flexión. De acuerdo con nuestros resultados, observamos disminuciones para ambos parámetros y un aumento en la amplitud de fluctuación desde 5.5 a 12.5 mM. Para la concentración de 25 mM fue prácticamente la misma situación que para 12.5 mM, apreciándose un efecto de saturación. Los resultados de Laurdan GP (figura 5.7B), que muestran un aumento del GP, y en consecuencia una disminución de la fluidez, confirman los resultados de tensión obtenidos con TRMFS porque se espera que la fluidez disminuya con la tensión, como se muestra en las simulaciones de dinámica molecular [197].

Los resultados para la amplitud de fluctuación, el módulo de flexión y la tensión, indican efectos significativos en la dinámica de la membrana de los glóbulos rojos saludables después de 24 horas de incubación a diferentes concentraciones de D-glucosa. La hipótesis planteada sobre la proporcionalidad de las concentraciones de D-glucosa con la mayor cantidad de ATP disponible y sus consecuencias sobre la actividad no homeostática, sugiere que se deben hacer esfuerzos para medir las cantidades de ATP en función de las concentraciones de D-glucosa en condiciones *in vitro* para los glóbulos rojos. Esto, es debido a que no está del todo claro cuál es la relación entre la concentración de D-glucosa, el tiempo de incubación y la disponibilidad de ATP.

Es importante hacer notar que se deben tener consideraciones sobre el modelo utilizado. A bajas frecuencias, una consecuencia práctica del uso del modelo de membrana pasiva es que el ajuste del parámetro de tensión podría subestimarse debido a la actividad del RBC que no encaja completamente en el modelo de membrana pasiva cuando hay ATP disponible en la célula [31, 131]. A pesar de lo anterior, las conclusiones presentadas permanecen debido a que se están comparando comportamientos y tendencias.

A modo de perspectiva futura, nuevos trabajos deberían establecer un vínculo sólido entre las relaciones presentadas para una mejor comprensión de los procesos dentro y fuera del equilibrio. Los resultados anteriores permitirían corroborar las hipótesis planteadas. Además, debido a que este trabajo estudia los efectos de la D-glucosa sobre los glóbulos rojos de un paciente sano, un futuro experimento podría considerar los glóbulos rojos de pacientes humanos con diabetes para comparar cómo se ven afectados los parámetros mecánicos bajo este tipo de condiciones. En este sentido, se ha usado la microscopía de fuerza atómica (AFM) para determinar que los glóbulos rojos de pacientes diabéticos son menos deformables en comparación con los glóbulos rojos de pacientes sanos [198], mientras que usando un modelo de células completas de dos componentes para el estudio

de las propiedades biomecánicas, reológicas y dinámicas de los glóbulos rojos, se determinó que hay una reducción significativa en la respuesta de estiramiento de los glóbulos rojos de pacientes diabéticos en comparación con los normales a la misma fuerza de tracción [199]. Estos resultados muestran alteraciones significativas en las propiedades mecánicas de la membrana plasmática de los glóbulos rojos de pacientes diabéticos, pero no es posible extrapolar nuestros resultados *in vitro* con estos hallazgos. Así, para los ensayos *in vitro*, es necesario aumentar la concentración o el tiempo de incubación de D-glucosa hasta rangos de 40 – 80 mM y 48 – 72 horas, respectivamente. Esto permitiría inducir alteraciones que imiten la condición patológica. Por lo tanto, los resultados presentados en el actual trabajo corresponden a una respuesta fisiológica de glóbulos rojos sanos para mantener la homeostasis, regular las propiedades de la membrana plasmática y para mantener el metabolismo de manera de sobrevivir en un ambiente estresante.

### 5.5.2. Discusión de correlaciones

Los resultados de la correlación de Pearson entre parámetros promedios, sugieren la simetría de la membrana de RBC alrededor del borde, en el sentido de que cualquier valor medio de parámetro mecánico será similar para la célula. Además, es importante aclarar que esta simetría considera un radio de  $\sim 250$  nm para cada punto de medición, lo cual, no está en conflicto con la existencia de posibles inhomogeneidades por debajo de ese tamaño. En el tamaño del haz de medición, los resultados de las amplitudes de fluctuación son necesariamente un efecto promedio. Superar la técnica más allá del límite de difracción de Rayleigh, contribuirá a la investigación en campos asociados a los lípidos, microdominios y subestructuras de membrana.

Los resultados de la correlación de Pearson mostrados en la tabla 5.6 y las figuras 5.4A-5.4D muestran una anticorrelación moderada en el desplazamiento de la membrana para bajas frecuencias (tiempos de ventana largos) y estos valores disminuyen para altas frecuencias (tiempos de ventana cortos). A su vez, esta anticorrelación tiende a ser más fuerte con el aumento de la concentración de D-glucosa. Estos resultados sugieren que el aumento de las anticorrelaciones tiene un origen metabólico, es decir, no térmico. Esto se debe a que, para procesos térmicos o estocásticos correspondientes a frecuencias altas, se espera que las correlaciones sean bajas, tal como lo muestran los valores de anticorrelación para el análisis de una ventana de tiempo de 0.01 s (100 Hz). Este hecho respalda que los movimientos coordinados de baja frecuencia observados mediante los valores de anticorrelación para ventanas cada vez más largas, podrían ser interpretados como actividades fuera del equilibrio que modulan el movimiento completo de la célula. Es importante señalar además, que los resultados de anticorrelación obtenidos son independientes de un modelo. De acuerdo a la geometría del experimento, las señales anticorrelacionadas pueden ser interpretadas como dos tipos de movimientos. El primer movimiento se aproxima a un movimiento de expansión-contracción radial con el tiempo. Este *latido* del glóbulo rojo probablemente cambiará su volumen completo. El segundo movimiento, correspondería a un movimiento continuo de expansión-contracción en ambos ejes del glóbulo. En este caso, todo el volumen celular puede ser constante. Estos movimientos de vibración



se representan en las figuras 5.9A y 5.9B, respectivamente. Adicionalmente, en la figura 5.9C, se esquematiza la dispersión de la luz asociada a la detección de los movimientos planteados en las figuras 5.9A y 5.9B, los cuales, dan lugar a los valores de correlación negativos. Un aspecto relevante de los resultados es que las anticorrelaciones encontradas no tienen relación con ruidos mecánicos introducidos en el experimento pues, cualquier perturbación externa de este tipo, debería dar como resultado una señal positivamente correlacionada debido a la geometría del montaje de TRMFS de doble haz.

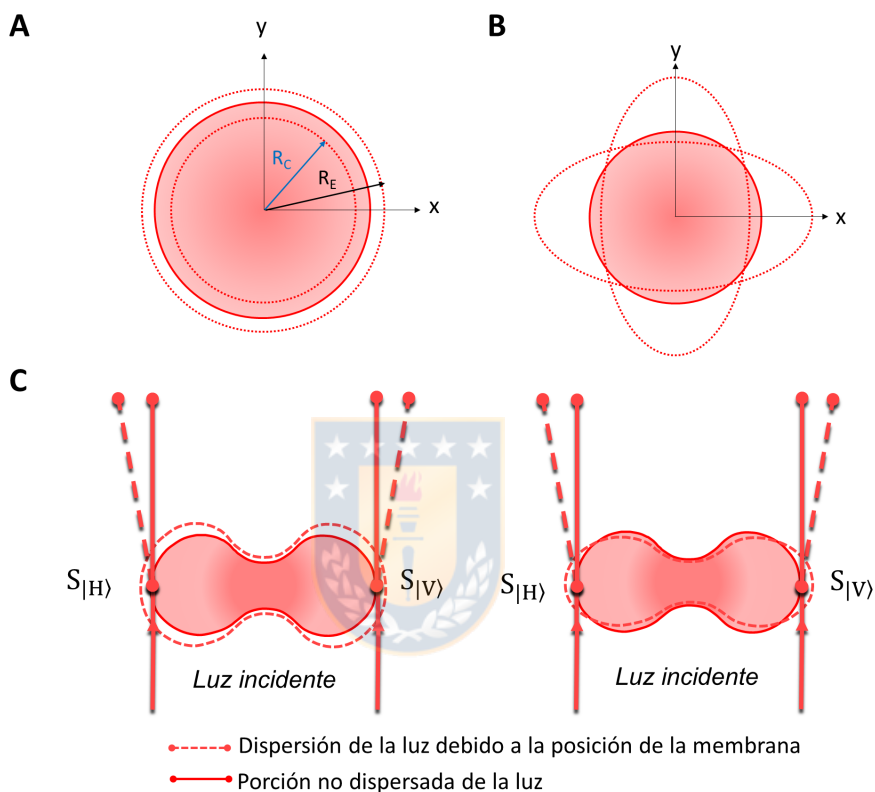


Figura 5.9: Interpretaciones de posibles movimientos de los glóbulos rojos asociados a los resultados de anticorrelación de Pearson. **A** está asociado con un cambio de volumen (expansión y contracción radial,  $R_E$  y  $R_C$ , respectivamente). **B** Modo de vibración que considera una expansión y contracción continua en ambos ejes donde es posible la conservación del volumen del glóbulo rojo. **C** Vista lateral de los movimientos anticorrelacionados y su relación con la detección. Tanto la figura de la izquierda, asociada con el movimiento en **A**, como la derecha asociada con **B**, muestran que la desviación del láser surge del *latido* de la membrana celular que desplaza ambos rayos láser en direcciones opuestas. Imagen de elaboración propia.

Si comparamos los posibles movimientos planteados en las figuras 5.9A y 5.9B con el análisis de imágenes de Laurdan, este último mostró que el aumento de las concentraciones de D-glucosa no produjo cambios en el volumen osmótico en la población general de glóbulos rojos. Sin embargo, el análisis de correlación dual puede mostrar un cambio

de volumen en los glóbulos rojos en el caso de que las correlaciones reflejen movimientos globales de estos.

Por otro lado, y de acuerdo a los resultados mostrados en la figura 5.6, el cálculo de las correlaciones cruzadas dieron cuenta de que la similaridad temporal entre las señales fluctúa en escalas de segundos y en donde además, esta fluctuación pudiese estar asociada a una función envolvente que muestra un decaimiento a 0 de los valores de correlación para un orden de tiempo de 10 segundos. Tanto la fluctuación como la envolvente apreciada en los gráficos pueden estar asociadas a diferentes procesos del glóbulo, tales como, procesos activos o pasivos. La determinación de la naturaleza de este comportamiento es motivo de estudios futuros.

Con respecto a trabajos futuros acerca de los movimientos anticorrelacionados, se deben implementar experimentos complementarios para confirmarlos y conocer su relación con la actividad metabólica discutida anteriormente. Para esto, y siguiendo el método de trabajos anteriores, los glóbulos rojos podrían ser expuestos a falta de disponibilidad de ATP para determinar si estos latidos persisten. Además, el estado actual de la técnica TRMFS puede evolucionar a una medición de cuatro puntos para confirmar o descartar el cambio de volumen de los glóbulos rojos con métodos de correlación más precisos. En este sentido, el modelo de red espectral-membrana podría complementarse con estos resultados para obtener un modelo completo de procesos activos en los glóbulos rojos.

### 5.5.3. Sobre las diferencias estadísticas de los haces de medición y polarización

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 5.2 y las tablas 5.3 y 5.4, se puede observar una notoria diferencia en la distribución de estadísticas para los parámetros mecánicos entre los dos puntos de medición. En general, los resultados de  $S_{|V\rangle}$  tienen mejores separaciones estadísticas entre los resultados, como se ve en las pruebas ANOVA (tabla 5.4). La única asimetría presente en la configuración experimental es la polarización entre ambos haces de medición,  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$ . Esto puede deberse a la polarización de la membrana en presencia de agua y solutos del PBS. La orientación de la polarización de la luz con respecto a la membrana puede estar alterando las propiedades mecánicas. La polarización de  $S_{|H\rangle}$  es perpendicular a la membrana celular, por lo que puede estar polarizando la interacción entre la membrana y el medio circundante, disminuyendo la viscosidad efectiva y provocando una mayor amplitud de fluctuación. Se debe tener en cuenta que esta posible alteración mecánica se produce a baja potencia del láser. En el contexto de las pinzas ópticas, se sabe que la polarización de la luz puede alterar la dirección del potencial de atrapamiento en mezclas críticas [200]. Es importante notar que, incluso si esto es una desventaja del sistema de detección, muestra un posible efecto de la polarización de la luz en las membranas. Por lo anterior, desde un punto de vista físico, será relevante estudiar los efectos de la orientación de la polarización de la luz sobre los parámetros mecánicos de la membrana. Se puede realizar un experimento simple con

la misma configuración para TRMFS duales para confirmar estos efectos. En este nuevo experimento, se podría realizar un intercambio de ambos haces polarizados para tener en cuenta las posibles diferencias mecánicas.

## 5.6. Discusión de uso de coordenada diferencial y SNR en TRMFS de doble pinza en régimen de baja potencia

Si bien la técnica TRMFS de dos haces (pinzas ópticas dobles en régimen de atrapamiento débil) en principio no está enfocada en realizar análisis de mejoras en resolución, sus características de medición permitieron realizar un proceso de análisis de SNR similar al de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, en el cual, se compara el valor de SNR en señales individuales de posición,  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ , con el de una señal diferencial  $S_{|diff}$  (coordenada diferencial). Para el cálculo del SNR del presente trabajo, se utilizó una analogía a lo realizado por Moffitt et al. [5, 10], conceptos que ya han sido presentados en la sección 2.5.3 y, en donde los detalles de cómo fueron calculadas las señales y el SNR para cada señal, han sido presentados en la sección 5.4.

Los resultados indicados en la figura 5.8 muestran que, en la mayoría de los casos, el SNR de la señal diferencial mejoró respecto de las señales individuales. Un total de 14 pasos permitió el cálculo de 13 valores de SNR para cada señal permitiendo determinar un valor medio de SNR de 1.32, 1.66 y 2.14 para las señales  $S_{|V}$ ,  $S_{|H}$  y  $S_{|diff}$ , respectivamente. Respecto a estos valores medios, se aprecia claramente una mejora al comparar la señal  $S_{|diff}$  con respecto a  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ . Otro análisis posible es observar la mediana de los valores de SNR para las tres coordenadas los cuales son 1.47, 1.59 y 1.94 para  $S_{|V}$ ,  $S_{|H}$  y  $S_{|diff}$ , respectivamente. Estos valores centrales, si bien no son tan altos comparativamente a las medias, siguen confirmando que el uso de una señal diferencial permite la mejora del valor de SNR. De acuerdo a estos resultados, se puede establecer que la construcción de coordenadas diferenciales a partir de la implementación de TRMFS de doble haz, podría permitir observar cambios diferenciales entre las fluctuaciones en dos puntos con mejoras en los niveles de ruido respecto a señales individuales. Otras aplicaciones respecto a esta coordenada deben ser estudiadas en profundidad considerando la naturaleza del objeto biológico analizado, en este caso, un glóbulo rojo. Por otro lado, si bien es posible establecer valores de SNR mediante esta herramienta de medición, es razonable pensar que no es completamente equivalente a las pinzas dobles de atrapamiento fuerte. Lo anterior, surge al considerar que los resultados de este análisis de SNR fueron obtenidos desde las señales de calibración. Esto hizo posible realizar la analogía con las señales de estiramiento de hebras de ADN pues, en ambos casos, las señales cuentan con escalones que muestran el desplazamiento del objeto biológico estudiado respecto al haz. Si bien esto permite para ambas situaciones generar la señal diferencial y calcular valores de SNR, tanto para esta señal como para las individuales, la naturaleza del estudio en la que se basan las mediciones es diferente. De esta manera, se debe considerar que una estimación exacta de mejoras

en resolución en TRMFS de dos haces a partir de las coordenadas diferenciales puede ser dificultoso, pues para el cálculo del SNR, las señales de los pasos que producen los escalones, correspondientes a desplazamientos de haz de  $\sim 30 \mu\text{m}$ , tienen incorporada la información de fluctuación de la membrana. Así, para llegar a conclusiones finales acerca de la real mejora en la resolución espacial, el origen biológico de las señales de posición utilizadas para el análisis del SNR en este trabajo, debe ser considerado de manera de poder comparar los resultados de reducción de ruido obtenidos a partir de estudios de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte que investigan otros especímenes biológicos. Finalmente, si bien el análisis de SNR muestra que los cambios de voltaje (escalones) entre pasos se pueden diferenciar con menos ruido a partir de señales diferenciales, los resultados de fluctuaciones y parámetros mecánicos obtenidos para la membrana de glóbulos rojos aportan otro punto de vista acerca de la resolución pues, estos nos indican, que la herramienta de TRMFS de pinzas dobles en régimen de atrapamiento débil es capaz de diferenciar con precisiones nanométricas. Por último, será necesario determinar la naturaleza de la mejora del SNR observado al usar coordenadas diferenciales dado que, para TRMFS de doble haz, no existen ecuaciones propuestas que relacionen estas posibles mejoras con parámetros físicos del experimento, tal como la mostrada en [10] para pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte.

## 5.7. Pinzas ópticas dobles en régimen de alta potencia para atrapamiento fuerte

Los resultados de la herramienta de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte se relacionan con la caracterización de las trampas  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  que la conforman. A partir de esto, fue posible la conversión de voltaje a nanómetros de las señales de posición X e Y de las esferas atrapadas y el cálculo de las constantes de rigidez en ambos ejes de las trampas, las cuales, permiten hacer estimaciones de sus fuerzas de atrapamiento. Los resultados de la caracterización y estimaciones realizadas, son presentadas en esta sección.

### 5.7.1. Caracterización de pinzas de atrapamiento fuerte y determinación de factor de conversión $\beta$

En este trabajo, la caracterización de las trampas  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$ , que conforman las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte, se realiza a partir de las frecuencias de corte  $f_c$  y constantes de difusión de Einstein  $D_{\text{Volt}}$  obtenidas desde el ajuste de una función Lorentziana sobre las PSDs experimentales de las señales de posición en los ejes X e Y de las partículas atrapadas en cada trampa. Esta función Lorentziana corresponde a la PSD teórica para una partícula atrapada en un potencial óptico. El valor  $D_{\text{Volt}}$  extraído para cada señal, permite determinar su respectivo factor de conversión  $\beta$  que la transforma desde una señal de voltaje a nanómetros. Por su parte, el valor  $f_c$  y el  $D_{\text{Volt}}$  extraídos para cada señal, hacen posible calcular el valor de las constantes de rigidez  $\bar{\kappa}$  para los ejes X e Y de cada trampa. Para realizar lo anterior, se utilizó un programa estándar usado en análisis

de pinzas ópticas [84], el cual, permite extraer las PSDs de las señales de posición de las esferas atrapadas en las pinzas  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ . Para cada trampa, se adquirieron las señales de posición X e Y de la esfera atrapada. Una característica relevante de este programa es que cuenta con una herramienta que previamente elimina la información cruzada entre las señales X e Y de cada trampa  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$  (Cross-Talk), y además, permite visualizar la distribución Gaussiana de las señales de posición X e Y de cada esfera, lo que da cuenta de la naturaleza browniana de su movimiento dentro de un potencial de atrapamiento.

La extracción de las PSDs de las señales de posición los ejes X e Y de las esferas atrapadas en las trampas  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ , son mostradas en las figuras 5.10, 5.11, 5.12 y 5.13 para 4 distancias de separación entre ellas que corresponden a 0, 2.85, 5.71 y 11.42  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Cada distancia de separación entre las trampas es denominada  $\Delta X$ . Las mediciones a diferentes separaciones fueron logradas desplazando sólo una de las trampas, correspondiente a  $S_{|V}$ . Estas cuatro distancias fueron consideradas para estudiar la estabilidad de los valores característicos de la trampas y la posible influencia de entre ellas cuando se encuentran cercanas. Esto último podría originarse por efectos de polarización. A todas las PSDs de las figuras 5.10, 5.11, 5.12 y 5.13, se les ajustó una función Lorentziana que describe el movimiento teórico de una partícula atrapada en un pozo potencial (ver sección 2.2). Los ajustes de las PSDs fueron realizados dentro del rango de 100 – 8000 Hz para evitar influencias de las bajas frecuencias, y se definieron como parámetros de ajuste, el radio de la esfera (1  $\mu\text{m}$ ), la distancia de la esfera atrapada a la superficie del cubreobjeto (5  $\mu\text{m}$ ), la densidad de la esfera de poliestireno (1.04  $\text{g}/\text{cm}^3$ ), la densidad del fluido (1  $\text{g}/\text{cm}^3$ , agua a 20 °C), la viscosidad cinemática del fluido ( $1 \times 10^{-6}$   $\text{m}^2/\text{s}$ ), y además, se definió considerar los efectos de filtro de los detectores QPD (*fdiode-eff*, 1 parámetro). Por su parte, la potencia de salida del láser utilizada para el atrapamiento, fue de aproximadamente 3.254 W (60 % de corriente en caja de control), correspondiente a  $\sim 0.5$  W por cada trampa a la entrada del lente objetivo de atrapamiento. Los ajustes realizados, considerando todos estos parámetros, permitieron extraer la frecuencia de corte  $f_c$  en Hz y el valor de la constante de difusión de Einstein  $D$  en unidades (U.A.)<sup>2</sup>/s desde cada señal analizada. Para el caso del parámetro  $D$ , U.A. corresponde a unidades arbitrarias relacionadas con la unidad de medición de las señales de posición, que para las mediciones presentadas, son realizadas en voltaje. Por lo anterior, (U.A.)<sup>2</sup>/s es equivalente a  $\text{V}^2/\text{s}$ . Por su parte, las unidades arbitrarias con las que son presentadas las PSDs están relacionadas también con la unidad en que se miden las señales de posición, siendo en este caso, equivalentes a  $\text{V}^2/\text{Hz}$ .

A partir de los valores de  $f_c$  y  $D$  obtenidos desde los ajustes, se pudo calcular el factor de conversión  $\beta$  para las señales X e Y de las trampas  $S_{|V}$  y  $S_{|H}$ , como también, sus constantes de rigidez  $\bar{\kappa}$  en ambos ejes usando las ecuaciones 4.4 y 4.5 presentadas en la sección 4.7. En los cálculos, fue considerada la viscosidad dinámica como  $\eta = 1 \times 10^{-3}$  Pa·s para determinar la constante de difusión de Einstein de referencia  $D = 2.15 \times 10^{-13}$   $\text{m}^2/\text{s}$ . Todas las estimaciones fueron realizadas para cada una de las distancias de separación  $\Delta X$  analizadas. En la tabla 5.7, se muestra el resumen de estos valores, tanto de los extraídos desde los ajustes como de los que fueron derivados.

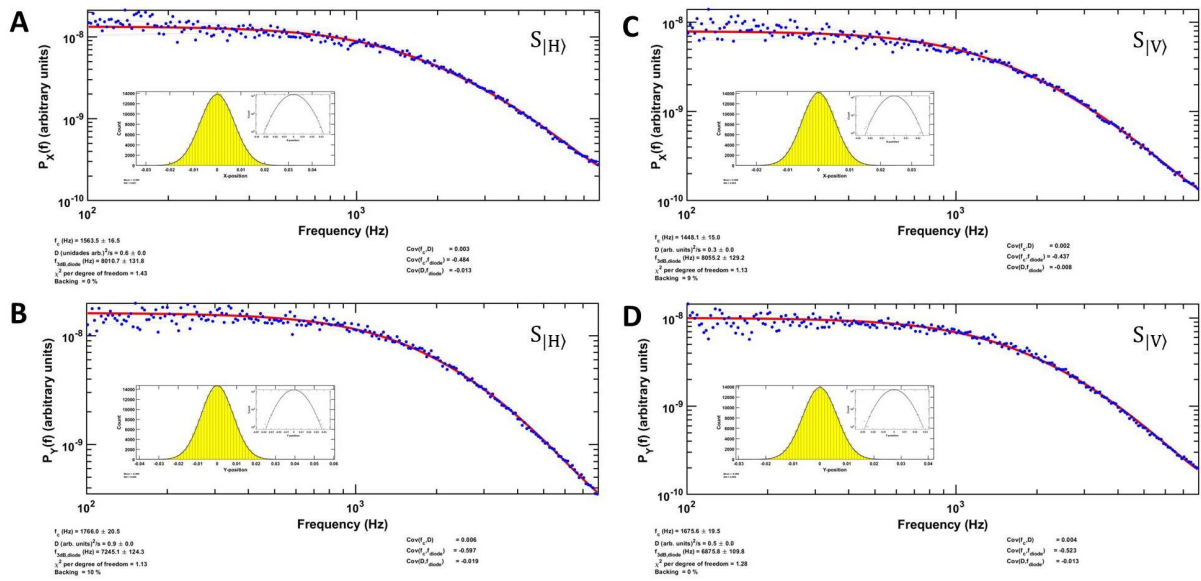


Figura 5.10: PSDs en unidades arbitrarias para señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S_{|H}$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S_{|V}$  (C (eje X), D (eje Y)) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 0 \mu\text{m}$ . Se realizó un ajuste Lorentziano (línea roja) sobre los datos experimentales (círculos azules) para los valores característicos de cada trampa.

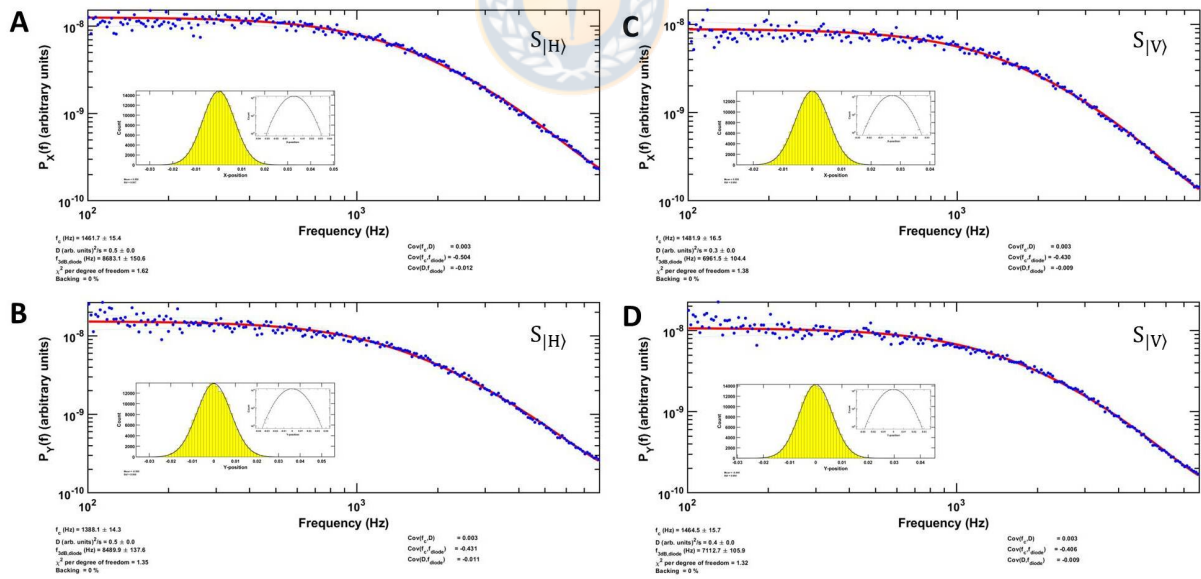


Figura 5.11: PSDs en unidades arbitrarias para señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S_{|H}$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S_{|V}$  (C (eje X), D (eje Y)) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 2.85 \mu\text{m}$ . Se realizó un ajuste Lorentziano (línea roja) sobre los datos experimentales (círculos azules) para los valores característicos de cada trampa.



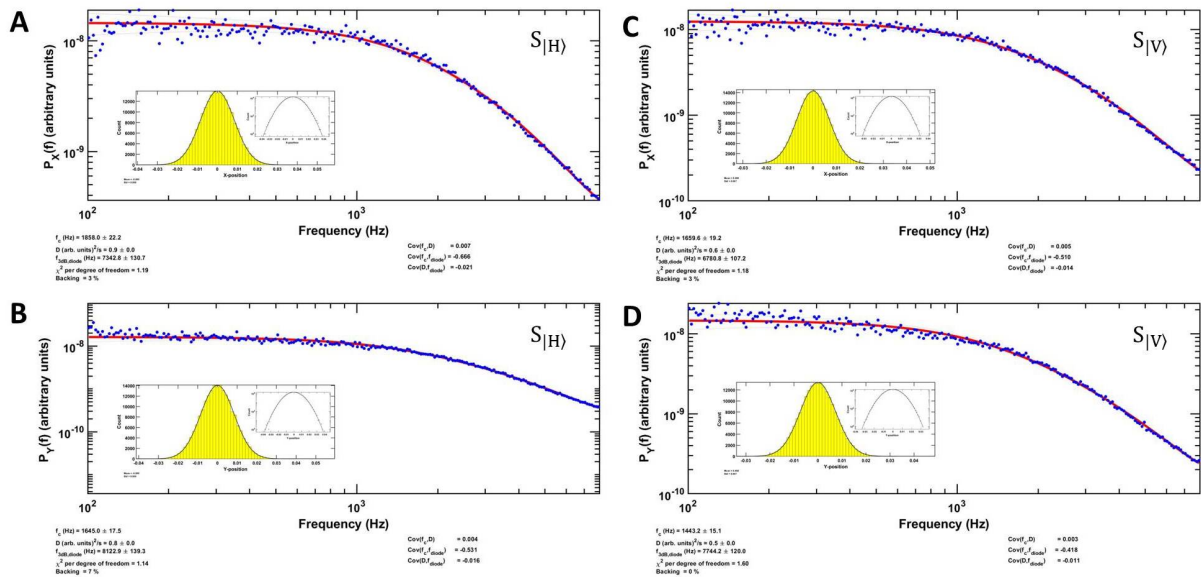


Figura 5.12: PSDs en unidades arbitrarias para señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S_{|H}$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S_{|V}$  (C (eje X), D (eje Y)) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 5.71 \mu\text{m}$ . Se realizó un ajuste Lorentziano (línea roja) sobre los datos experimentales (círculos azules) para los valores característicos de cada trampa.

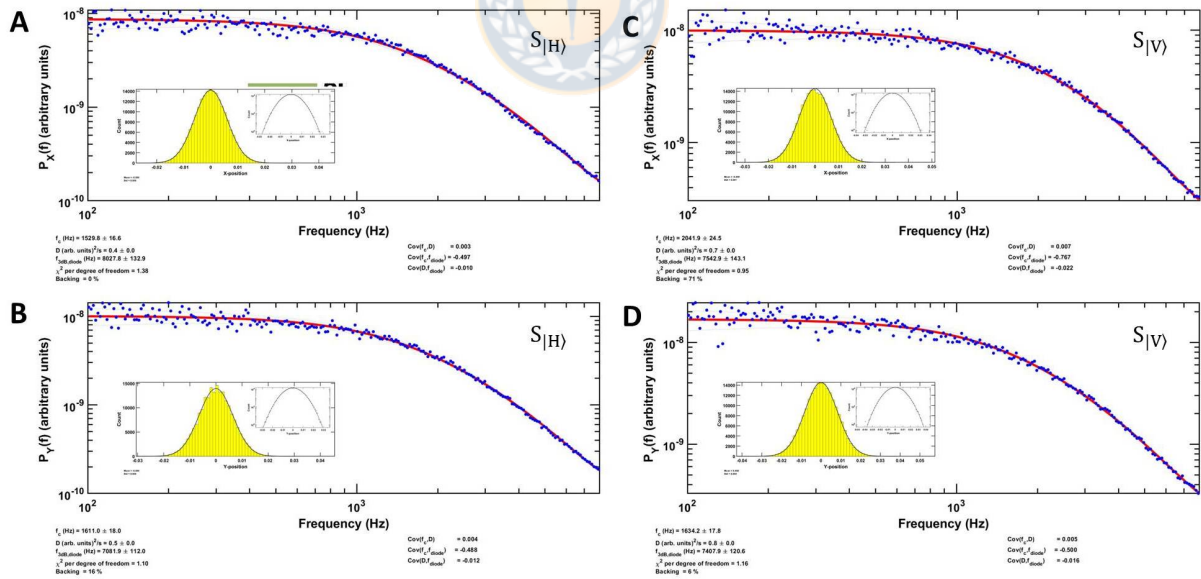


Figura 5.13: PSDs en unidades arbitrarias para señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S_{|H}$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S_{|V}$  (C (eje X), D (eje Y)) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 11.42 \mu\text{m}$ . Se realizó un ajuste Lorentziano (línea roja) sobre los datos experimentales (círculos azules) para los valores característicos de cada trampa.

Trampa	$\Delta X$ ( $\mu\text{m}$ )	$f_{cX}$ (Hz)	$f_{cY}$ (Hz)	$D_X$ ( $\frac{\text{V}^2}{\text{s}}$ )	$D_Y$ ( $\frac{\text{V}^2}{\text{s}}$ )	$\beta_X$ ( $10^{-7}\frac{\text{m}}{\text{V}}$ )	$\beta_Y$ ( $10^{-7}\frac{\text{m}}{\text{V}}$ )	$\bar{\kappa}_X$ ( $10^{-4}\frac{\text{N}}{\text{m}}$ )	$\bar{\kappa}_Y$ ( $10^{-4}\frac{\text{N}}{\text{m}}$ )
$S_{ H\rangle}$	0	1563.5	1766.0	0.6	0.9	5.98	4.88	1.85	2.09
	2.85	1461.7	1388.1	0.5	0.5	6.55	6.55	1.73	1.64
	5.71	1858.0	1645.0	0.9	0.8	4.88	5.18	2.20	1.95
	11.42	1529.8	1611.0	0.4	0.5	7.33	6.55	1.81	1.91
$S_{ V\rangle}$	0	1448.1	1675.6	0.3	0.5	8.46	6.55	1.71	1.98
	2.85	1481.9	1464.5	0.3	0.4	8.46	7.33	1.75	1.73
	5.71	1659.6	1443.2	0.6	0.5	5.98	6.55	1.96	1.71
	11.42	2041.9	1634.2	0.7	0.8	5.53	5.18	2.42	1.93

Tabla 5.7: Tabla resumen con los valores de caracterización de las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. Los valores corresponden a las pinzas asociadas a  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$  en donde  $\Delta X$  corresponde a la distancia de separación entre trampas,  $f_{cX}$  y  $f_{cY}$  (ejes X e Y, respectivamente) a las frecuencias de corte,  $D_X$  y  $D_Y$  (ejes X e Y, respectivamente) a las constantes de difusión de Einstein en unidades de  $\text{V}^2/\text{s}$ ,  $\beta_X$  y  $\beta_Y$  a los factores de conversión de voltaje a nanómetros de las señales de posición y  $\bar{\kappa}_X$  y  $\bar{\kappa}_Y$  a las constantes de rigidez de las trampas en ambos ejes.

### 5.7.2. Conversión de señales de fluctuación y PSDs mediante uso de $\beta$

A partir de los resultados mostrados en la tabla 5.7, se aplicó el factor de conversión  $\beta$  a las señales de posición X e Y de las trampas  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  para las 4 diferentes distancias de separación. Los resultados de la conversión de estas señales desde voltaje a nanómetros son mostradas en las figuras 5.14, 5.15, 5.16 y 5.17, las cuales, corresponden a los casos en que la trampas se encuentran separadas 0, 2.85, 5.71 y 11.42  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Además, en cada figura se muestra la STD de la señal en nanómetros para indicar el desplazamiento de las esferas atrapadas en sus ejes X e Y respecto al centro de las trampas  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$

Adicionalmente, utilizando el mismo factor de conversión  $\beta$  y considerando la relaciones de las ecuaciones 2.21 y 4.3, las PSDs mostradas en las figuras 5.10, 5.11, 5.12 y 5.13, que corresponden a las señales expuestas en las figuras 5.14, 5.15, 5.16 y 5.17, respectivamente, fueron convertidas desde unidades de  $\text{V}^2/\text{Hz}$  a  $\text{nm}^2/\text{Hz}$  al igual que sus ajustes. Los resultados de la conversión de las PSDs son mostradas en las figuras 5.18, 5.19, 5.20 y 5.21 para los casos de separación entre las trampas de 0, 2.85, 5.71 y 11.42  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

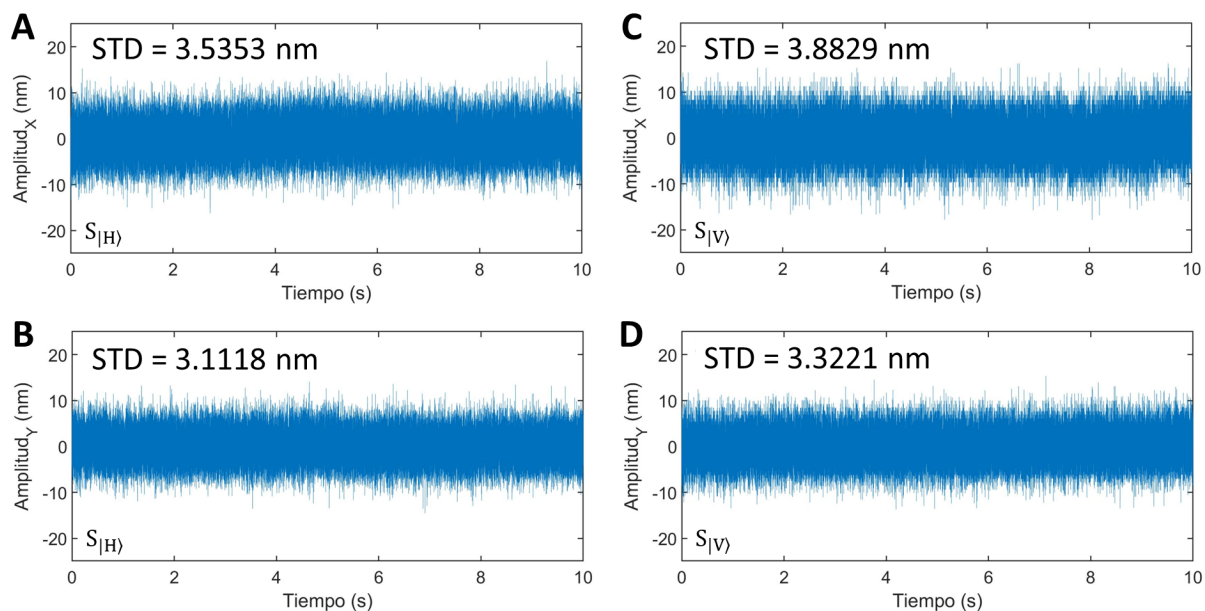


Figura 5.14: Señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S_{|H\rangle}$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S_{|V\rangle}$  (C (eje X) y D (eje Y)) convertidas a nanómetros (nm) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 0 \mu\text{m}$ . Para cada señal se indica su STD, y la conversión de cada una de ellas, se realizó usando los factores  $\beta$  correspondiente indicados en en la tabla 5.7.

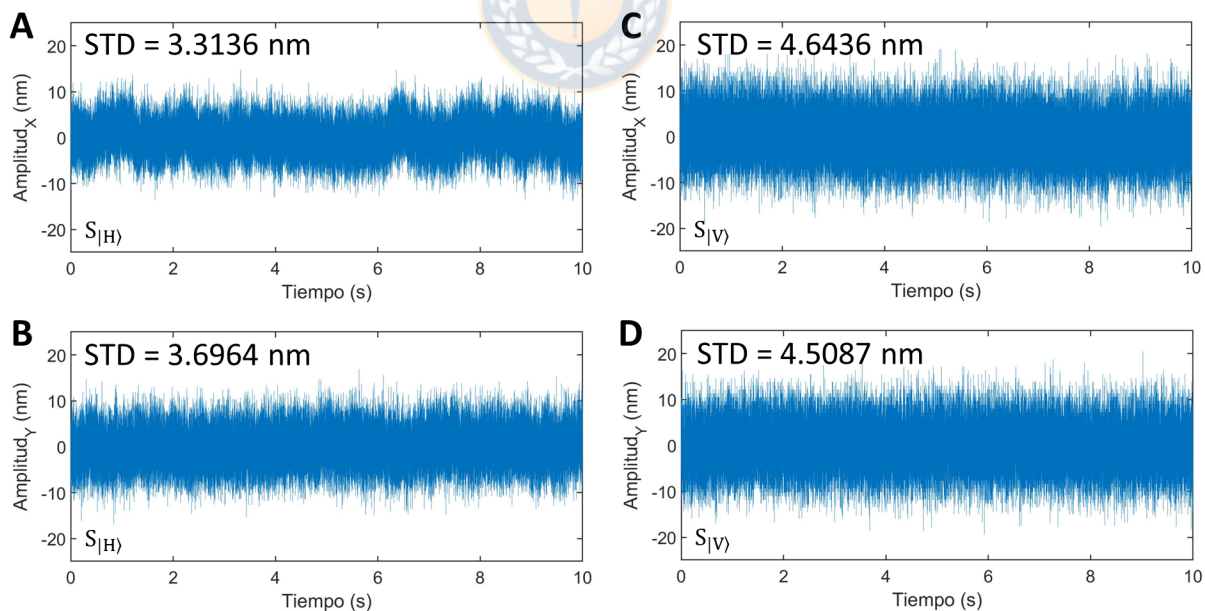


Figura 5.15: Señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S_{|H\rangle}$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S_{|V\rangle}$  (C (eje X) y D (eje Y)) convertidas a nanómetros (nm) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 2.85 \mu\text{m}$ . Para cada señal se indica su STD, y la conversión de cada una de ellas, se realizó usando los factores  $\beta$  correspondiente indicados en en la tabla 5.7.

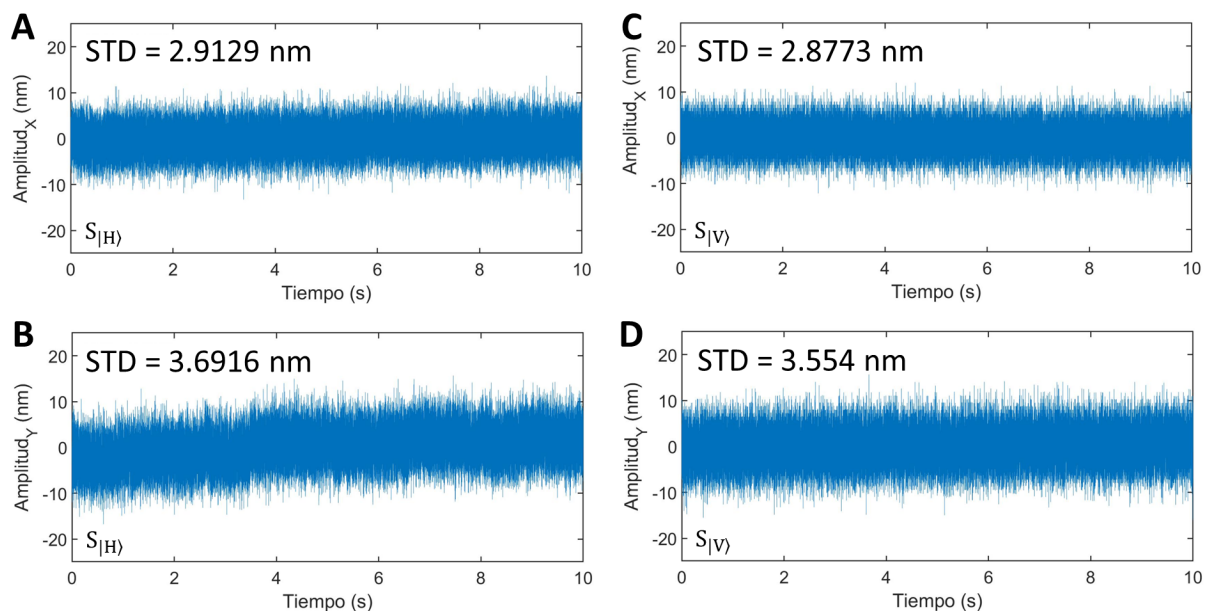


Figura 5.16: Señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S_{|H\rangle}$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S_{|V\rangle}$  (C (eje X) y D (eje Y)) convertidas a nanómetros (nm) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 5.71 \mu\text{m}$ . Para cada señal se indica su STD, y la conversión de cada una de ellas, se realizó usando los factores  $\beta$  correspondiente indicados en en la tabla 5.7.

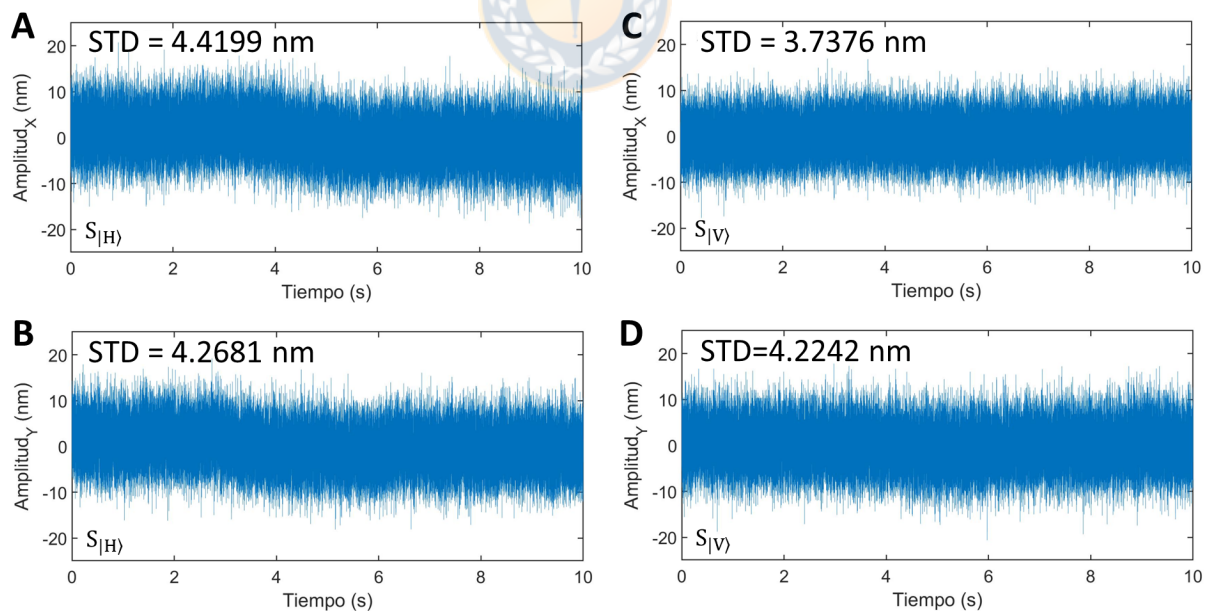


Figura 5.17: Señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S_{|H\rangle}$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S_{|V\rangle}$  (C (eje X) y D (eje Y)) convertidas a nanómetros (nm) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 11.42 \mu\text{m}$ . Para cada señal se indica su STD, y la conversión de cada una de ellas, se realizó usando los factores  $\beta$  correspondiente indicados en en la tabla 5.7.



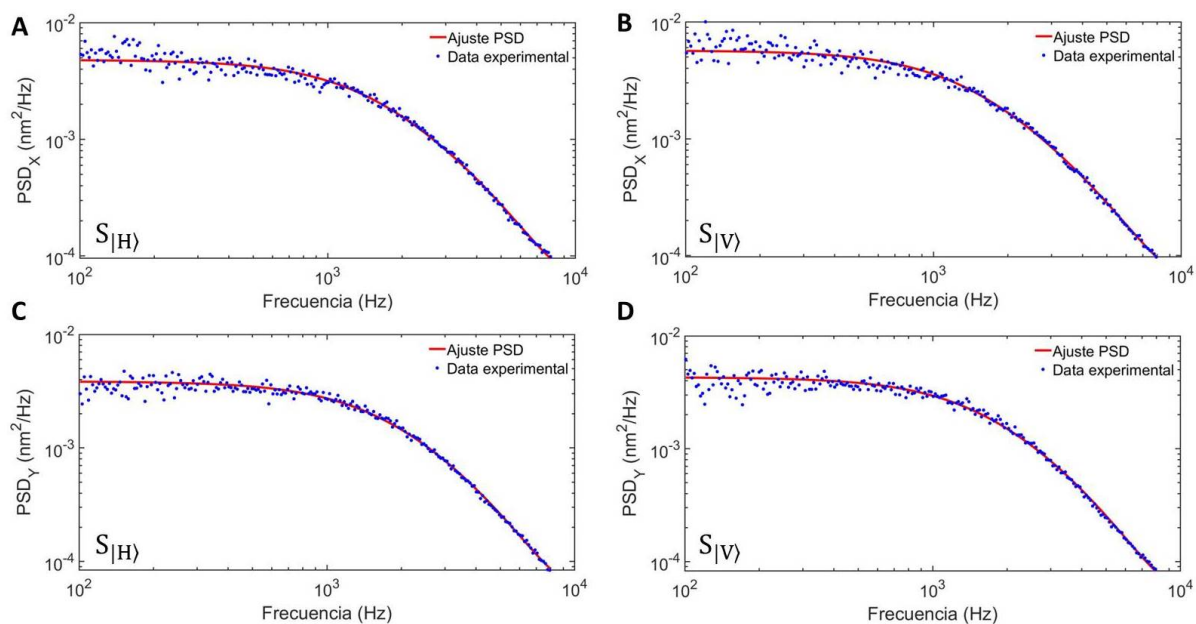


Figura 5.18: PSDs en unidades de  $\text{nm}^2/\text{Hz}$  para señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S|H$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S|V$  (C (eje X) y D (eje Y)) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 0 \mu\text{m}$ . Sobre cada PSD se representa un ajuste Lorentziano (línea roja) sobre los datos experimentales (círculos azules).

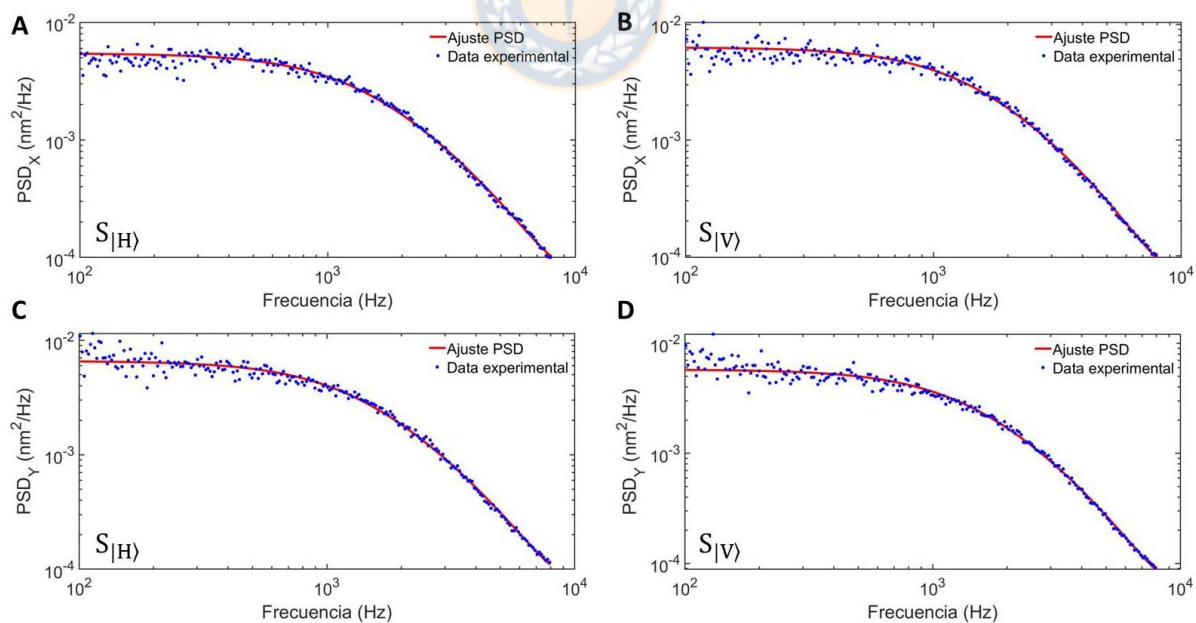


Figura 5.19: PSDs en unidades de  $\text{nm}^2/\text{Hz}$  para señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S|H$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S|V$  (C (eje X) y D (eje Y)) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 2.85 \mu\text{m}$ . Sobre cada PSD se representa un ajuste Lorentziano (línea roja) sobre los datos experimentales (círculos azules).

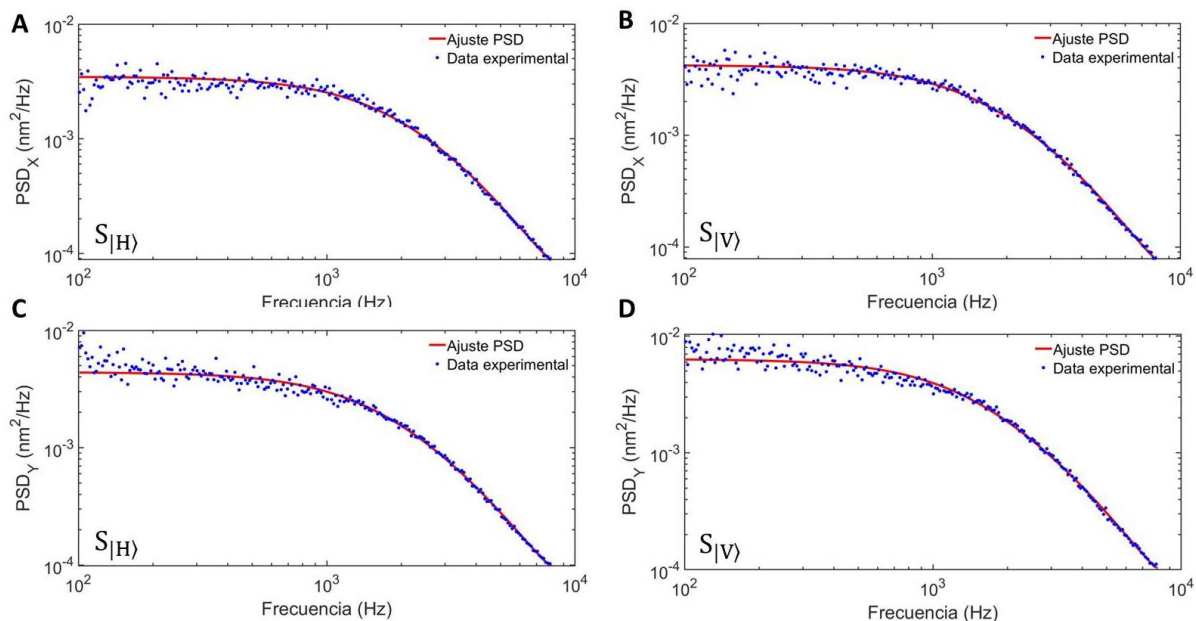


Figura 5.20: PSDs en unidades de  $\text{nm}^2/\text{Hz}$  para señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S|H$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S|V$  (C (eje X) y D (eje Y)) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 5.71 \mu\text{m}$ . Sobre cada PSD se representa un ajuste Lorentziano (línea roja) sobre los datos experimentales (círculos azules).

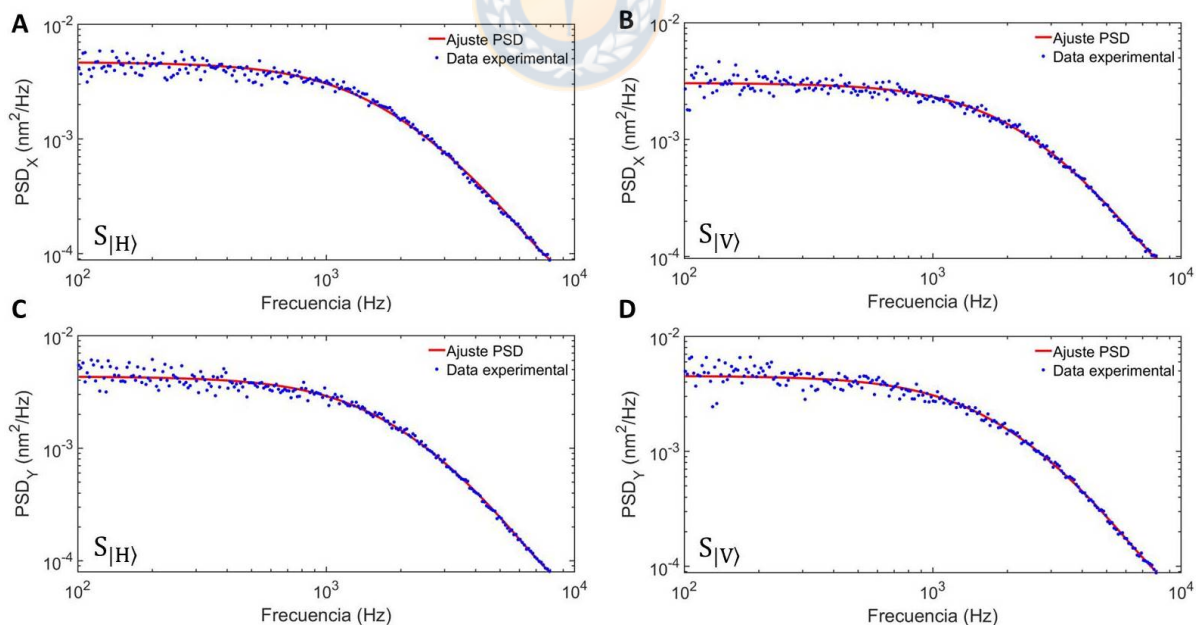


Figura 5.21: PSDs en unidades de  $\text{nm}^2/\text{Hz}$  para señales de posición X e Y de esferas en trampas  $S|H$  (A (eje X) y B (eje Y)) y  $S|V$  (C (eje X) y D (eje Y)) cuando estas están separadas por un  $\Delta X = 11.42 \mu\text{m}$ . Sobre cada PSD se representa un ajuste Lorentziano (línea roja) sobre los datos experimentales (círculos azules).



Finalmente, en la tabla 5.8 son resumidos los valores de los desplazamientos en nanómetros en los ejes X e Y de las esferas atrapadas respecto al centro de las trampas  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$ . Los desplazamientos son representados mediante la STD de las señales X e Y de las trampas  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  ya convertidas a nanómetros al aplicarles el factor de conversión  $\beta$  a ambos ejes. Estos valores corresponden a los obtenidos mediante las conversiones de las señales presentadas en las figuras 5.14, 5.15, 5.16 y 5.17 para los casos en que la trampas se encuentran separadas 0, 2.85, 5.71 y 11.42  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Trampa	$\Delta X$ ( $\mu\text{m}$ )							
	0		2.85		5.71		11.42	
	STD (nm)							
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
$S_{ H\rangle}$	3.5353	3.1118	3.3136	3.6964	2.9129	3.6916	4.4199	4.2681
$S_{ V\rangle}$	3.8829	3.3221	4.6436	4.5087	2.8773	3.5540	3.7376	4.2242

Tabla 5.8: Resumen de los valores de desplazamiento de las esferas dentro de las trampas respecto al centro de estas en unidades de nanómetros obtenidos en las figuras 5.14, 5.15, 5.16 y 5.17. Estos desplazamientos son representados mediante la STD de las señales X e Y de las trampas  $S_{|V\rangle}$  y  $S_{|H\rangle}$  ya convertidas a nanómetros al aplicarles el factor de conversión  $\beta$ . Los resultados son presentados para las 4 diferentes distancias de separación  $\Delta X$  entre las trampas mencionadas, es decir, 0, 2.85, 5.71 y 11.42  $\mu\text{m}$ .

## 5.8. Discusión de resultados de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte

De acuerdo a los resultados obtenidos para la caracterización de la trampa, resumidos en la tabla 5.7, se puede establecer en primer lugar un análisis entorno a similaridad de las frecuencias de corte  $f_{c_x}$  y  $f_{c_y}$  en cada trampa. Para cada trampa, y para todas las distancias de separación, se observa una asimetría entre las frecuencias y  $f_{c_x}$  y  $f_{c_y}$ . Lo anterior implica que, cada trampa en particular, no ejercerá probablemente en forma exacta la misma fuerza en ambos ejes. Si se compara ahora la diferencia del valor de  $f_{c_x}$  entre  $S_{|H\rangle}$  y  $S_{|V\rangle}$ , la disparidad en los valores se mantiene al igual que cuando comparamos los valores de  $f_{c_y}$ . Esta última comparación puede tener efectos al ejercer fuerzas de manera unidimensional sobre algún objeto de estudio. Si pensamos en una hebra de ADN, esta se puede estirar sobre el eje X. Si  $f_{c_x}$  es muy disímil entre ambas trampas, es esperable que ambas trampas no ejerzan la misma fuerza. Esto será importante si consideramos lo expuesto en trabajos de coordenadas diferenciales [10], en donde dos trampas de igual constante de rigidez  $\bar{\kappa}$  permiten disminuir el SNR de las mediciones. Así, las constantes de rigidez  $\bar{\kappa}$  de dos trampas serán similares si ambas tienen la misma frecuencia de corte. Para mejorar las similaridad de las frecuencias de corte entre los ejes de cada trampa y de los ejes entre ellas, se deberán considerar correcciones en aspectos tales como, la estabilidad de la cámara en donde están contenidas las esferas atrapadas, y las estabilidades

mecánicas en general.

En relación a las conversión de las señales desde voltaje a nanómetros, se puede indicar que las señales muestran una dispersión de posiciones de las esferas dentro de las trampas en un rango de 3 – 4 nm. En relación a la estabilidad apreciable en las señales, se observa que la señal de posición de  $S_{|V\rangle}$  tiene un comportamiento un poco más estable que en  $S_{|H\rangle}$ . Esta situación, se hace más evidente en las figuras 5.16 y 5.17 correspondientes a las distancias de separación 5.71 y 11.42  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Asociar este comportamiento a la distancia de separación  $\Delta X$  entre las trampas se hace complejo si pensamos en que no debiesen influenciarse entre ellas. Una hipótesis más plausible debiese estar relacionada con inestabilidades o características locales del fluido en el lugar en donde se encuentra la trampa perturbada  $S_{|H\rangle}$ . En este sentido, es posible incluso que exista una perturbación temporal dentro de la señal debido a una pequeña bacteria que pasa por el fluido circundante sin ser atrapada. Esto último, se fundamenta en que no en todas las señales de  $S_{|H\rangle}$  se aprecian perturbaciones de la misma magnitud, y que estas, son disímiles en algunos casos para X e Y.

Al considerar los valores de  $\bar{\kappa}$  para todas las distancias obtenidos a partir de una potencia del láser de aproximadamente 3.254 W, los cuales son mostrados en la tabla 5.7, se observa que las constantes de rigidez  $\bar{\kappa}_X$  se mueven en el rango  $[1.71 - 2.42] \times 10^{-4}$  N/m, y las de  $\bar{\kappa}_Y$ , en el rango  $[1.64 - 2.09] \times 10^{-4}$  N/m. Si estos valores son convertidos a unidades de pN/nm, se tiene que el rango para  $\bar{\kappa}_X$  es  $[0.171 - 0.242]$  pN/nm con un valor medio de 0.2065 pN/nm, y para  $\bar{\kappa}_Y$ , es  $[0.164 - 0.209]$  pN/nm con un valor medio de 0.1865 pN/nm. Estos valores pueden ser entonces comparados con los obtenidos en otros trabajos similares, tales como el de pinzas ópticas dobles para uso de coordenadas diferenciales de Moffitt et al. [10]. En este trabajo, sus valores de  $\bar{\kappa}$ , definidos para una sola coordenada, se mueven en un rango de  $[0.07 - 0.19]$  pN/nm cuando se considera el atrapamiento de dos esferas idénticas de 860 nm de diámetro para el estiramiento de ADN. En este caso en particular, su más bajo SNR al estirar una hebra de ADN fue conseguido cuando ambas trampas tuvieron la misma constante de rigidez  $\bar{\kappa} = 0.13$  pN/nm, justo en el medio del rango antes indicado. Estos valores de rigidez, tanto para los conseguidos en el actual trabajo como el que se ha mencionado a modo de comparación, pueden ser interpretados a partir de fuerzas. Así, el valor medio 0.2065 pN/nm para  $\bar{\kappa}_X$  nos dice que, si un objeto ligado a la esfera la desplaza 1 nm desde el centro de la trampa, entonces esta ejercerá una fuerza en sentido contrario sobre la esfera de magnitud 0.2065 pN. Por su parte, el valor medio 0.1865 pN/nm de  $\bar{\kappa}_Y$  indica que si la esfera atrapada es desplazada 1 nm desde su centro en el eje Y, la trampa ejercerá una fuerza de restauración en sentido contrario al desplazamiento de 0.1865 pN. Al igual que en los dos casos anteriores, el valor medio óptimo de referencia, es decir, el presentado por Moffitt [10], indica que las trampas asociadas a ese trabajo ejercerán una fuerza de 0.13 pN sobre las esferas si estas son desplazadas 1 nm desde su centro. Si bien nuestro caso es para dos esferas atrapadas de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, y los valores de potencia utilizados para el atrapamiento pueden ser diferentes, se puede observar que los órdenes de magnitud del presente trabajo y el de coordenadas diferenciales de Moffitt [10], son similares.

# Capítulo 6

## Conclusión

El presente trabajo de tesis, abordó el desafío de implementar y caracterizar esquemas de pinzas ópticas dobles con el objetivo de construir coordenadas diferenciales a partir de dos señales independientes que permitan evaluar, a través de algún parámetro representativo, mejoras de la resolución espacial en la detección de desplazamientos en sistemas biológicos que presenten correlaciones entre dos puntos de medición. Para este fin, fueron implementados sistemas de medición basados en esquemas de pinzas ópticas de haz individual y doble para regímenes de baja y alta potencia asociados a las técnicas de TRMFS, para medición de fluctuaciones de membrana, y a pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte.

El principal aporte de esta tesis fue lograr la implementación de la técnica TRMFS de doble haz, un esquema de pinzas ópticas que opera a bajas potencias sin provocar atrapamiento en los objetos y que permite medir la fluctuación de una membrana biológica en dos puntos diferentes. Esta técnica ha sido desarrollada hasta el momento sólo en esquema de pinza única, lo cual no permite la evaluación de correlaciones entre dos puntos de una membrana biológica como si lo hace la implementación de TRMFS de doble haz de este trabajo. Si bien los esquemas de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte técnicamente permiten realizar estudios de correlaciones entre dos puntos mediante la adhesión de esferas en las membranas, hasta el momento la técnica de medición de TRMFS de doble haz en donde el atrapamiento no es necesario para medir fluctuaciones, no ha sido implementada y cuenta con la ventaja de ser mínimamente invasiva.

Desde el punto de vista de los objetivos planteados para el actual trabajo, se puede establecer que el esquema de doble pinza para TRMFS permitió evaluar y mostrar evidencia de movimientos correlacionados entre dos puntos de la membrana y, a la vez, permitió construir una señal o coordenada diferencial que muestra el potencial de tener un mejor valor de SNR respecto al de las dos señales individuales de la medición con que fue construida.

Este resultado de SNR implica que la resolución espacial puede mejorar si se usan señales diferenciales, y además, permite interpretar que su origen se encuentra en las correlaciones observadas entre los dos puntos de medición, en concordancia con la literatura

estudiada.

Otro esquema de pinzas ópticas dobles fue construido para atrapamiento fuerte, el cual fue caracterizado y mostró capacidades para el estudio de molécula única al comparar sus parámetros característicos con herramientas del mismo tipo presentadas en otros trabajos y que han sido utilizadas en investigaciones como la mencionada. Si bien esta implementación corresponde a la herramienta clásica utilizada para la evaluación de la mejora en la resolución espacial a partir de una coordenada diferencial construida a partir de dos señales correlacionadas, esta evaluación no fue posible pues se debe completar aún la etapa de unión de un espécimen biológico a las dos esferas que se atrapan mediante esta herramienta. Se debe mencionar además, que en este trabajo no sólo se realizaron aportes técnicos como el ya mencionado, sino que también, se realizaron aportes en el ámbito de la biología al implementar la técnica de TRMFS de haz único. Esta implementación permitió estudiar y mostrar los efectos protectores del resveratrol en las membranas de glóbulos rojos. De manera adicional, se debe indicar que a la fecha en que este trabajo de tesis ha sido entregado, los resultados de TRMFS de haz único aplicado al estudio de los efectos protectores del resveratrol en membranas de glóbulos rojos han sido publicados [201] y, los resultados de TRMFS de doble haz, han sido enviados a una revista científica para su evaluación [202], respecto a lo cual, se está a la espera de la revisión de pares. Se debe indicar junto a esto, que los resultados preliminares de TRMFS de doble haz, fueron previamente expuestos en un congreso relacionado a óptica biomédica [203]. Además, durante el periodo del programa de doctorado, se logró la publicación de investigación asociada a cámaras plenópticas [204], resultados que son potencialmente aplicables a contextos biológicos complementarios a TRMFS y que están asociados a, por ejemplo, el desarrollo de microscopía de desenfoque para reconstrucción de volúmenes celulares tales como glóbulos rojos.

Las conclusiones particulares que se derivadan a partir del actual trabajo son descritas a continuación.

Las herramientas de medición basadas en esquemas de pinzas ópticas permitieron determinar el comportamiento de las fluctuaciones y propiedades mecánicas de glóbulos rojos expuestos a moléculas de resveratrol y de D-glucosa. No obstante, desde un interés físico, el desarrollo de estas herramientas de medición permitió caracterizar y evaluar los niveles de resolución espacial de este tipo de instrumentación para esquemas de pinzas únicas y dobles, en concordancia con los objetivos de este trabajo.

Una primera evaluación de las capacidades resolutivas fue realizada en función de los resultados obtenidos para TRMFS de haz único y TRMFS de doble haz. Mediante TRMFS de haz único, fue posible establecer diferencias estadísticas entre dos poblaciones de glóbulos rojos en que sus fluctuaciones medias están separadas por 6.9 nm. Desde otro punto de vista, las mediciones individuales de las fluctuaciones medias tuvieron un error máximo y mínimo de 2.6 nm y 1.4 nm, respectivamente, cuando estos errores están representados por la STD de los datos. Sin embargo, dado que el valor promedio de las fluctuaciones

de cada población surge de promediar medias individuales de glóbulos rojos, una forma más correcta de establecer una estimación de los errores de las fluctuaciones debiese ser el uso del error estándar (SEM). Esta manera de estimar el error es usada en múltiples trabajos del área y está enfocada en indicar cuál es el error asociado a la media poblacional (fluctuación promedio para una condición) estimada a partir de medias muestrales (fluctuaciones medias de glóbulos individuales). Así, mientras más medias muestrales sean utilizadas para calcular la media poblacional, menor será el error de esta última. Esto fue considerado al procesar los resultados en la herramienta TRMFS de doble haz en el estudio de los efectos de la D-glucosa sobre la fluctuación de los glóbulos rojos. En sus resultados, y desde una estimación conservadora, se pudo establecer una diferencia significativa entre las fluctuaciones medias de dos grupos de glóbulos rojos separadas por un valor de 2.8 nm (para  $S_{|V}$ ), entre 5.5 – 12.5 mM de D-glucosa). En relación a las fluctuaciones medias para cada condición, estas entregaron un error máximo y mínimo de 0.55 nm y 0.35 nm, respectivamente, al ser calculados considerando el SEM. Esto último permite interpretar que el error de la fluctuación media poblacional es de un orden sub-nanométrico. En consecuencia, se puede decir que la resolución espacial de la técnica de TRMFS permite distinguir entre fluctuaciones medias de poblaciones de glóbulos rojos expuestos a diferentes condiciones diferenciadas por nanómetros con errores asociados a las medias del orden de los subnanómetros cuando es usada la definición de SEM, la cual, se considera más correcta para la metodología de medición usada. Es importante resaltar que trabajos similares de TRMFS de pinza débil única han realizado estas consideraciones estadísticas y han conseguido resoluciones espaciales del mismo orden.

Por otro lado, el análisis relacionado con mejoras de resolución usando un esquema de pinzas ópticas dobles mediante uso de correlaciones y de la coordenada diferencial, se realizó usando los datos obtenidos con TRMFS de doble haz de una manera equivalente al realizado en pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. Si bien la herramienta de pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte fue montada y caracterizada, esta no fue utilizada para analizar mejoras de resolución mediante correlaciones debido a que aún se está en proceso de optimizar la técnica de unión entre esferas de poliestireno y espécimen biológico.

En relación a los resultados de la herramienta TRMFS de doble haz, estos permitieron observar que existen anticorrelaciones de Pearson entre las señales de los dos haces que la componen. La correlación de Pearson entrega una lectura de la correlación lineal entre dos señales, comparando sus comportamientos punto a punto. En este sentido, las señales de fluctuación de los dos puntos de medición mostraron anticorrelaciones crecientes a medida que las frecuencias fueron más bajas, es decir, cuando las anticorrelaciones fueron calculadas utilizando ventanas temporales de la señal cada vez más grandes. Los máximos valores alcanzados en estas frecuencias pueden ser calificados de grado medio ya que tuvieron valores  $\sim 0.4$ . Adicionalmente, se analizaron las correlaciones cruzadas de las señales temporales de TRMFS de doble haz. Estas mostraron que existen ciertos grados de correlación temporal entre dos señales descritas por una función oscilante de periodicidad en el orden de los segundos. Estas correlaciones caen a cero luego de un tiempo de 10 segundos. El origen de estas correlaciones debe ser estudiado.

Considerando los resultados mencionados respecto a la existencia de correlaciones, se utilizaron las dos señales de TRMFS de doble haz para analizar el SNR de una señal diferencial en comparación con las señales individuales. Los resultados mostraron que al restar ambas señales y analizar esta nueva coordenada, denominada diferencial, el valor del SNR en la mayoría de los casos fue superior al obtenido para las señales individuales. Es importante considerar que TRMFS de doble haz no cuenta con una expresión que relacione la mejora del SNR con correlaciones y variables físicas del experimento en forma explícita, algo con que sí cuentan las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte. De esta manera, las mejoras del SNR observadas en la señal diferencial deben ser estudiadas en mayor profundidad para este contexto de manera de confirmar su relación con las correlaciones encontradas. En consecuencia, el uso de una señal diferencial en TRMFS de doble haz se debe explorar tanto teóricamente como desde el punto de vista de las aplicaciones particulares relacionadas a la técnica.

Finalmente, la caracterización de las pinzas ópticas dobles de atrapamiento fuerte mostraron que su estado de desarrollo instrumental permitiría, potencialmente, que esta sea usada en experimentos de estiramiento de especímenes biológicos. Esta afirmación se basa en el hecho de que las constantes de rigidez  $\bar{\kappa}$  de ambas trampas, en sus dos ejes, tienen magnitudes similares a las alcanzadas en el trabajo de Moffitt et al. [10], en el cual, se estiran hebras de ADN con mejoras de resolución espacial. Estos valores permitirían aplicar fuerzas suficientes sobre este tipo de hebras de manera de desenrollarlas y caracterizarlas físicamente. Por otro lado, no fueron observadas perturbaciones ni consecuencias en los valores característicos debido a la separación de las trampas. En relación a mejoras futuras en el sistema, se deberá seguir trabajando en su estabilidad mecánica debido a perturbaciones observadas en las señales de posición de las esferas atrapadas. También, se deberá considerar la corrección de la disparidad que existe en los valores de  $f_c$  y  $\bar{\kappa}$  entre los ejes de cada trampa y la diferencia entre los  $f_c$  y  $\bar{\kappa}$  al comparar un mismo eje entre las trampas. Todas estas consideraciones permitirían llevar a cabo experimentos sobre especímenes biológicos de una manera completamente controlada.



# Bibliografía

- [1] Ashkin, A. (1970). *Physical Review Letters*, 24(4), 156.
- [2] Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., & Chu, S. (1986). *Optics letters*, 11(5), 288-290.
- [3] Ashkin, A. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 4853-4860.
- [4] Neuman, K. C., & Block, S. M. (2004). *Review of Scientific Instruments*, 75(9), 2787-2809.
- [5] Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., Smith, S. B., & Bustamante, C. (2008). *Biochemistry*, 77(1), 205.
- [6] Gao, D., Ding, W., Nieto-Vesperinas, M., Ding, X., Rahman, M., Zhang, T., Lim, C. T., & Qiu, C. W. (2017). *Optical manipulation from the microscale to the nanoscale: fundamentals, advances and prospects. Light: Science & Applications*, 6(9), e17039.
- [7] Muldoon, C., Brandt, L., Dong, J., Stuart, D., Brainis, E., Himsforth, M., & Kuhn, A. (2012). *New Journal of Physics*, 14(7), 073051.
- [8] Abad, L. V. (2012). *Principles of classical statistical mechanics: A perspective from the notion of complementarity. Annals of Physics*, 327(6), 1682-1693.
- [9] Aguilar-Ibañez, C., Suarez-Castanon, M. S., & Rosas-Soriano, L. I. (2011). *International Journal of Robust and Nonlinear Control*, 21(3), 328-337.
- [10] Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., Izhaky, D., & Bustamante, C. (2006). *PNAS*, 103(24), 9006-9011.
- [11] Bustamante, C., Chemla, Y. R., & Moffitt, J. R. (2009). *High-resolution dual-trap optical tweezers with differential detection: an introduction. Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb-top60.
- [12] Bustamante, C., Chemla, Y. R., & Moffitt, J. R. (2009). *High-resolution dual-trap optical tweezers with differential detection: instrument design. Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb-ip73.

- [13] Bustamante, C., Chemla, Y. R., & Moffitt, J. R. (2009). High-resolution dual-trap optical tweezers with differential detection: Managing environmental noise. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb-ip72.
- [14] Bustamante, C., Chemla, Y. R., & Moffitt, J. R. (2009). High-resolution dual-trap optical tweezers with differential detection: alignment of instrument components. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb-ip76.
- [15] Bustamante, C., Chemla, Y. R., & Moffitt, J. R. (2009). High-resolution dual-trap optical tweezers with differential detection: Minimizing the influence of measurement noise. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb-ip75.
- [16] Bustamante, C., Chemla, Y. R., & Moffitt, J. R. (2009). High-resolution dual-trap optical tweezers with differential detection: data collection and instrument calibration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb-ip74.
- [17] Bustamante, C., Chemla, Y. R., Forde, N. R., & Izhaky, D. (2004). Mechanical processes in biochemistry. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 705-748.
- [18] Bronkhorst, P. J., Streekstra, G. J., Grimbergen, J., Nijhof, E. J., Sixma, J. J., & Brakenhoff, G. J. (1995). A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. *Biophysical journal*, 69(5), 1666-1673.
- [19] Huruta, R. R., Barjas-Castro, M. L., Saad, S. T. O., Costa, F. F., Fontes, A., Barbosa, L. C., & Cesar, C. L. (1998). Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers. *Blood*, 92(8), 2975-2977.
- [20] Henon, S., Lenormand, G., Richert, A., & Gallet, F. (1999). A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophysical journal*, 76(2), 1145-1151.
- [21] Sleep, J., Wilson, D., Simmons, R., & Gratzner, W. (1999). Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study. *Biophysical journal*, 77(6), 3085-3095.
- [22] Lenormand, G., Hénon, S., Richert, A., Siméon, J., & Gallet, F. (2001). Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton. *Biophysical Journal*, 81(1), 43-56.
- [23] Dao, M., Lim, C. T., & Suresh, S. (2003). Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 51(11-12), 2259-2280.
- [24] Brandao, M. M., Fontes, A., Barjas-Castro, M. L., Barbosa, L. C., Costa, F. F., Cesar, C. L., & Saad, S. T. O. (2003). Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. *European journal of haematology*, 70(4), 207-211.

- [25] Mills, J. P., Qie, L., Dao, M., Lim, C. T., & Suresh, S. (2004). Nonlinear elastic and viscoelastic deformation of the human red blood cell with optical tweezers. *MCB-TECH SCIENCE PRESS*-, 1, 169-180.
- [26] Li, J., Dao, M., Lim, C. T., & Suresh, S. (2005). Spectrin-level modeling of the cytoskeleton and optical tweezers stretching of the erythrocyte. *Biophysical journal*, 88(5), 3707-3719.
- [27] Mohanty, S. K., Mohanty, K. S., & Gupta, P. K. (2005). Dynamics of Interaction of RBC with optical tweezers. *Optics express*, 13(12), 4745-4751.
- [28] Li, C., & Liu, K. K. (2008). Nanomechanical characterization of red blood cells using optical tweezers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(4), 1529-1535.
- [29] Liao, G. B., Bareil, P. B., Sheng, Y., & Chiou, A. (2008). One-dimensional jumping optical tweezers for optical stretching of bi-concave human red blood cells. *Optics Express*, 16(3), 1996-2004.
- [30] Fontes, A., Fernandes, H. P., de Thomaz, A. A., Barbosa, L. C., Barjas-Castro, M. L., & Cesar, C. L. (2008). Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1), 014001.
- [31] Betz, T., Lenz, M., Joanny, J. F., & Sykes, C. (2009). ATP-dependent mechanics of red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15320-15325.
- [32] Li, Y., Wen, C., Xie, H., Ye, A., & Yin, Y. (2009). Mechanical property analysis of stored red blood cell using optical tweezers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 70(2), 169-173.
- [33] Musielak, M. (2009). Red blood cell-deformability measurement: review of techniques. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 42(1), 47-64.
- [34] Bankapur, A., Zachariah, E., Chidangil, S., Valiathan, M., & Mathur, D. (2010). Raman tweezers spectroscopy of live, single red and white blood cells. *PLoS one*, 5(4), e10427.
- [35] Rancourt-Grenier, S., Wei, M. T., Bai, J. J., Chiou, A., Bareil, P. P., Duval, P. L., & Sheng, Y. (2010). Dynamic deformation of red blood cell in dual-trap optical tweezers. *Optics express*, 18(10), 10462-10472.
- [36] Tan, Y., Sun, D., Wang, J., & Huang, W. (2010). Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers. *IEEE Transactions on biomedical engineering*, 57(7), 1816-1825.

- [37] Tavano, F., Bonin, S., Pinato, G., Stanta, G., & Cojoc, D. (2011). Custom-built optical tweezers for locally probing the viscoelastic properties of cancer cells. *International Journal of Optomechatronics*, 5(3), 234-248.
- [38] Fontes, A., Castro, M. B., Brandao, M. M., Fernandes, H. P., Thomaz, A. A., Huruta, R. R., Pozzo, L. Y., Barbosa, L. C., Costa, F. F., Saad, S. T. O., & Cesar, C. L. (2011). Mechanical and electrical properties of red blood cells using optical tweezers. *Journal of Optics*, 13(4), 044012.
- [39] Betz, T., & Sykes, C. (2012). Time resolved membrane fluctuation spectroscopy. *Soft Matter*, 8(19), 5317-5326.
- [40] Lyubin, E. V., Khokhlova, M. D., Skryabina, M. N., & Fedyanin, A. A. (2012). Cellular viscoelasticity probed by active rheology in optical tweezers. *Journal of biomedical optics*, 17(10), 101510.
- [41] Onda, K., & Arai, F. (2012). Multi-beam bilateral teleoperation of holographic optical tweezers. *Optics express*, 20(4), 3633-3641.
- [42] Moura, D. S., Silva, D. C., Williams, A. J., Bezerra, M. A., Fontes, A., & de Araujo, R. E. (2015). Automatic real time evaluation of red blood cell elasticity by optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 86(5), 053702.
- [43] Lee, K., Danilina, A. V., Kinnunen, M., Priezhev, A. V., & Meglinski, I. (2015). Probing the red blood cells aggregating force with optical tweezers. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 22(3), 365-370.
- [44] Betz, T., & Sykes, C. (2016). Correction: Time resolved membrane fluctuation spectroscopy. *Soft matter*, 12(11), 2976-2976.
- [45] Song, H., Liu, Y., Zhang, B., Tian, K., Zhu, P., Lu, H., & Tang, Q. (2017). Study of in vitro RBCs membrane elasticity with AOD scanning optical tweezers. *Biomedical optics express*, 8(1), 384-394.
- [46] Smart, T. J., Richards, C. J., Agrawal, R., & Jones, P. H. (2017, April). Stretching red blood cells with optical tweezers. In *Optical Trapping Applications* (pp. OtM4E-6). Optical Society of America.
- [47] Monzel, C., & Sengupta, K. (2016). Measuring shape fluctuations in biological membranes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(24), 243002.
- [48] Gárate, F., Betz, T., Pertusa, M., & Bernal, R. (2015). Time-resolved neurite mechanics by thermal fluctuation assessments. *Physical biology*, 12(6), 066020.
- [49] Gárate, F., Pertusa, M., Arana, Y., & Bernal, R. (2018). Non-invasive neurite mechanics in differentiated PC12 cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 194.

- [50] Gögler, M., Betz, T., & Käs, J. A. (2007). Simultaneous manipulation and detection of living cell membrane dynamics. *Optics letters*, 32(13), 1893-1895.
- [51] Zernike, F. (1942). *Physica*, 9(7), 686-698.
- [52] Zernike, F. (1942). *Physica*, 9(10), 974-986.
- [53] Murphy, D. (2001). *Fundamentals of Light Microscopy and Digital Imaging*, Wiley-Liss, New York, pages 97-112.
- [54] Richards, O. W. (1954). Phase Microscopy 1950-1954. *Science*, 120, 631-639.
- [55] Frohlich, V. C. (2008). *Journal of visualized experiments: JoVE*, (17).844 (2008).
- [56] Hostounský, Z., & Pelc, R. (2007). *Advances in physiology education*, 31(2), 232-235.
- [57] Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994). *Optics letters*, 19(11), 780-782.
- [58] Bustamante, C., Macosko, J. C., & Wuite, G. J. (2000). Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2), 130.
- [59] Bustamante, C., Bryant, Z., & Smith, S. B. (2003). Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature*, 421(6921), 423.
- [60] Zhuang, X. (2005). Single-molecule RNA science. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34, 399-414.
- [61] Tinoco, I., Li, P. T., & Bustamante, C. (2006). Determination of thermodynamics and kinetics of RNA reactions by force. *Quarterly reviews of biophysics*, 39(4), 325-360.
- [62] Greenleaf, W. J., Woodside, M. T., & Block, S. M. (2007). High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36, 171-190.
- [63] Cecconi, C., Shank, E. A., Bustamante, C., & Marqusee, S. (2005). Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule. *Science*, 309(5743), 2057-2060.
- [64] Finer, J. T., Simmons, R. M., & Spudich, J. A. (1994). Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368(6467), 113.
- [65] Liphardt, J., Onoa, B., Smith, S. B., Tinoco, I., & Bustamante, C. (2001). Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force. *Science*, 292(5517), 733-737.
- [66] Mehta, A. D., Rief, M., Spudich, J. A., Smith, D. A., & Simmons, R. M. (1999). Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science*, 283(5408), 1689-1695.

- [67] Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., Anderson, D. L., & Bustamante, C. (2001). The bacteriophage  $\varphi$  29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, 413(6857), 748.
- [68] Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J., & Block, S. M. (1993). Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365(6448), 721.
- [69] Visscher, K., Gross, S. P., & Block, S. M. (1996). Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2(4), 1066-1076.
- [70] Allersma, M. W., Gittes, F., deCastro, M. J., Stewart, R. J., & Schmidt, C. F. (1998). Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophysical journal*, 74(2), 1074-1085.
- [71] Gittes, F., & Schmidt, C. F. (1998). Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Optics letters*, 23(1), 7-9.
- [72] Pralle, A., Prummer, M., Florin, E. L., Stelzer, E. H. K., & Hörber, J. K. H. (1999). Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microscopy research and technique*, 44(5), 378-386.
- [73] Gittes, F., & Schmidt, C. F. (1998). Thermal noise limitations on micromechanical experiments. *European biophysics journal*, 27(1), 75-81.
- [74] Czerwinski, F., Richardson, A. C., & Oddershede, L. B. (2009). Quantifying noise in optical tweezers by allan variance. *Optics express*, 17(15), 13255-13269.
- [75] Taylor, M. A., & Bowen, W. P. (2013). Quantum noise in optical tweezers. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 467, No. 1, p. 012007). IOP Publishing.
- [76] Tay, J. W., Hsu, M. T., & Bowen, W. P. (2009). Quantum limited particle sensing in optical tweezers. *Physical Review A*, 80(6), 063806.
- [77] Ashkin, A. (1992). Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical journal*, 61(2), 569-582.
- [78] Wright, W. H., Sonek, G. J., & Berns, M. W. (1994). Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers. *Applied optics*, 33(9), 1735-1748.
- [79] Harada, Y., & Asakura, T. (1996). Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. *Optics communications*, 124(5-6), 529-541.
- [80] Viana, N. B., Rocha, M. S., Mesquita, O. N., Mazolli, A., Neto, P. M., & Nussenzveig, H. M. (2007). Towards absolute calibration of optical tweezers. *Physical Review E*, 75(2), 021914.



- [81] W. T. Coffey, Yu. P. Kalmykov, & J. T. Waldron. (1996). The Langevin equation: with applications in physics, chemistry and electrical engineering. World Scientific.
- [82] Deng, Y., Bechhoefer, J., & Forde, N. R. (2007). Brownian motion in a modulated optical trap. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9(8), S256.
- [83] Berg-Sørensen, K., & Flyvbjerg, H. (2004). Power spectrum analysis for optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 75(3), 594-612.
- [84] Tolić-Nørrelykke, I. M., Berg-Sørensen, K., & Flyvbjerg, H. (2004). MatLab program for precision calibration of optical tweezers. *Computer physics communications*, 159(3), 225-240.
- [85] Tolić-Nørrelykke, S. F., Schäffer, E., Howard, J., Pavone, F. S., Jülicher, F., & Flyvbjerg, H. (2006). Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane. *Review of scientific instruments*, 77(10), 103101.
- [86] Scott, B. (2019). *Elements of Quantum Optics*. Scientific e-Resources.
- [87] Beenakker, C. W. J., & Schönberger, C. (2003). Quantum shot noise. *Physics Today*, 56(5), 37-42.
- [88] Reznikov, M., De Picciotto, R., Heiblum, M., Glattli, D. C., Kumar, A., & Saminadayar, L. (1998). Quantum shot noise. *Superlattices and microstructures*, 23(3-4), 901-915.
- [89] Schottky, W. (1918). Über spontane Stromschwankungen in verschiedenen Elektrizitätsleitern. *Annalen der physik*, 362(23), 541-567.
- [90] Blanter, Y. M., & Büttiker, M. (2000). Shot noise in mesoscopic conductors. *Physics reports*, 336(1-2), 1-166.
- [91] Walker, I. R. (2011). *Reliability in scientific research: improving the dependability of measurements, calculations, equipment, and software*. Cambridge University Press.
- [92] Harris, C. M., & Piersol, A. G. (2002). *Harris' shock and vibration handbook (Vol. 5)*. New York: McGraw-Hill.
- [93] Thorlabs (s.f.). *Optical Tables Tutorial*. Recuperado desde [https://www.thorlabs.com/newgroupage9.cfm?objectgroup\\_id=8275](https://www.thorlabs.com/newgroupage9.cfm?objectgroup_id=8275) [Fecha de acceso: 2020].
- [94] I. Filinski and R. A. Gordon, *Rev. Sci. Instrum.* 65, 575 (1994).
- [95] Nieminen, T. A., Knöner, G., Heckenberg, N. R., & Rubinsztein-Dunlop, H. (2007). Physics of optical tweezers. *Methods in cell biology*, 82, 207-236.
- [96] Vega, C. P., & López, A. C. (2007). *Sistemas de telecomunicación (Vol. 7)*. Ed. Universidad de Cantabria.

- [97] Márquez Flores, J. (2014). *Ruido*. Disponible en <http://www.academicos.ccadet.unam.mx/jorge.marquez/cursos/Instrumentacion/Ruido.pdf> [Fecha de acceso: 2020].
- [98] Padgett, M. J., Molloy, J., & McGloin, D. (2010). *Optical Tweezers: methods and applications*. Chapman and Hall/CRC.
- [99] Neuman, K. C., & Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature methods*, 5(6), 491.
- [100] Ashkin, A., & Dziedzic, J. M. (1987). Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795), 1517-1520.
- [101] Ashkin, A., Dziedzic, J. M., & Yamane, T. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150), 769-771.
- [102] Ashkin, A. and Dziedzic, J.M. (1989) Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7914-7918].
- [103] Ashkin, A., Schütze, K., Dziedzic, J. M., Euteneuer, U., & Schliwa, M. (1990). Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap. *Nature*, 348(6299), 346-348.
- [104] Smith, S. B., Cui, Y., & Bustamante, C. (1996). Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271(5250), 795-799.
- [105] Svoboda, K., Schmidt, C. F., Branton, D., & Block, S. M. (1992). Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophysical journal*, 63(3), 784-793.
- [106] Tadir, Y., Wright, W. H., Vafa, O., Ord, T., Asch, R. H., & Berns, M. W. (1989). Micromanipulation of sperm by a laser generated optical trap. *Fertility and sterility*, 52(5), 870-873.
- [107] Berns, M. W., Wright, W. H., Tromberg, B. J., Profeta, G. A., Andrews, J. J., & Walter, R. J. (1989). Use of a laser-induced optical force trap to study chromosome movement on the mitotic spindle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(12), 4539-4543.
- [108] Liang, H., Wright, W. H., Cheng, S., He, W., & Berns, M. W. (1993). Micromanipulation of chromosomes in PTK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laserinduced optical force (optical tweezers). *Experimental cell research*, 204(1), 110-120.
- [109] Vorobjev, I. A., Liang, H., Wright, W. H., & Berns, M. W. (1993). Optical trapping for chromosome manipulation: a wavelength dependence of induced chromosome bridges. *Biophysical journal*, 64(2), 533-538.

- [110] Edidin, M., Kuo, S. C., & Sheetz, M. P. (1991). Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers. *Science*, 254(5036), 1379-1382.
- [111] Kusumi, A., Sako, Y., Fujiwara, T., & Tomishige, M. (1997). Application of laser tweezers to studies of the fences and tethers of the membrane skeleton that regulate the movements of plasma membrane proteins. In *Methods in cell biology* (Vol. 55, pp. 173-194). Academic Press.
- [112] Sako, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M., & Kusumi, A. (1998). Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton. *The Journal of cell biology*, 140(5), 1227-1240.
- [113] Abbondanzieri, E. A., Greenleaf, W. J., Shaevitz, J. W., Landick, R., & Block, S. M. (2005). Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature*, 438(7067), 460-465.
- [114] Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., Aathavan, K., Grimes, S., Jardine, P. J., Anderson, D. L., & Bustamante, C. (2009). Intersubunit coordination in a homomeric ring ATPase. *Nature*, 457(7228), 446-450.
- [115] Chen, J. Y., & Huestis, W. H. (1997). Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1323(2), 299-309.
- [116] Boon, J. M., & Smith, B. D. (2002). Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. *Medicinal research reviews*, 22(3), 251-281.
- [117] Devaux, P. F., & Zachowski, A. (1994). Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chemistry and Physics of Lipids*, 73(1-2), 107-120.
- [118] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 28(11-12), 693-703.
- [119] Helfrich, W. S. R. M., & Servuss, R. M. (1984). Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuovo Cimento D*, 3(1), 137-151.
- [120] Mutz, M., & Helfrich, W. (1990). Bending rigidities of some biological model membranes as obtained from the Fourier analysis of contour sections. *Journal de Physique*, 51(10), 991-1001.
- [121] Helfrich, W. (1978). Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 33(3), 305-315.
- [122] Grecco, H. E., Schmick, M., & Bastiaens, P. I. (2011). Signaling from the living plasma membrane. *Cell*, 144(6), 897-909.

- [123] Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78, 857-902.
- [124] Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R.G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., & Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402-413.
- [125] Bassereau, P., Sorre, B., & Lévy, A. (2014). Bending lipid membranes: experiments after W. Helfrich's model. *Advances in colloid and interface science*, 208, 47-57.
- [126] Waugh R, Evans EA. Thermoelasticity of red blood-cell membrane. *Biophys J* 1979;26:115–31.
- [127] Evans, E., & Rawicz, W. (1990). Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed fluid membranes. *Physical review letters*, 64(17), 2094.
- [128] Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D., & Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical journal*, 79(1), 328-339.
- [129] Rawicz, W., Smith, B. A., McIntosh, T. J., Simon, S. A., & Evans, E. (2008). Elasticity, strength, and water permeability of bilayers that contain raft microdomain-forming lipids. *Biophysical journal*, 94(12), 4725-4736.
- [130] Brown, A. T., Kotar, J., & Cicuta, P. (2011). Active rheology of phospholipid vesicles. *Physical Review E*, 84(2), 021930.
- [131] Turlier, H., Fedosov, D. A., Audoly, B., Auth, T., Gov, N. S., Sykes, C., Joanny, J. F., Gompper, G., & Betz, T. (2016). Equilibrium physics breakdown reveals the active nature of red blood cell flickering. *Nature Physics*, 12(5), 513-519.
- [132] Peterson, M. A., Strey, H., & Sackmann, E. (1992). Theoretical and phase contrast microscopic eigenmode analysis of erythrocyte flicker: amplitudes. *Journal De Physique II*, 2(5), 1273-1285.
- [133] Strey, H., Peterson, M., & Sackmann, E. (1995). Measurement of erythrocyte membrane elasticity by flicker eigenmode decomposition. *Biophysical Journal*, 69(2), 478-488.
- [134] Duwe, H. P., Kaes, J., & Sackmann, E. (1990). Bending elastic moduli of lipid bilayers: modulation by solutes. *Journal de Physique*, 51(10), 945-961.
- [135] Pécrcéaux, J., Döbereiner, H. G., Prost, J., Joanny, J. F., & Bassereau, P. (2004). Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *The European Physical Journal E*, 13(3), 277-290.

- [136] Brochard, F., & Lennon, J. F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *Journal de Physique*, 36(11), 1035-1047.
- [137] Schneider, M. B., Jenkins, J. T., & Webb, W. W. (1984). Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *Journal de Physique*, 45(9), 1457-1472.
- [138] Milner, S. T. (1987). ST Milner and SA Safran, *Phys. Rev. A* 36, 4371 (1987). *Phys. Rev. A*, 36, 4371.
- [139] Evans, E. (1994). E. Evans and A. Yeung, *Chem. Phys. Lipids* 73, 39 (1994). *Chem. Phys. Lipids*, 73, 39.
- [140] Seifert, U. (1993). U. Seifert and SA Langer, *Europhys. Lett.* 23, 71 (1993). *Europhys. Lett.*, 23, 71.
- [141] Zilman, A. G., & Granek, R. (1996). Undulations and dynamic structure factor of membranes. *Physical review letters*, 77(23), 4788.
- [142] Zilman, A. G., & Granek, R. (2002). Membrane dynamics and structure factor. *Chemical Physics*, 284(1-2), 195-204.
- [143] Arriaga, L. R., Rodríguez-García, R., López-Montero, I., Farago, B., Hellweg, T., & Monroy, F. (2010). Dissipative curvature fluctuations in bilayer vesicles: Coexistence of pure-bending and hybrid curvature-compression modes. *The European Physical Journal E*, 31(1), 105-113.
- [144] T. Pott & P. Mlard, *Europhys. Lett.*, 2002, 59, 7.
- [145] Rodríguez-García, R., Arriaga, L. R., Mell, M., Moleiro, L. H., López-Montero, I., & Monroy, F. (2009). Bimodal spectrum for the curvature fluctuations of bilayer vesicles: Pure bending plus hybrid curvature-dilation modes. *Physical review letters*, 102(12), 128101.
- [146] Sikharulidze, I., Farago, B., Dolbnya, I. P., Madsen, A., & de Jeu, W. H. (2003). Surface and bulk elasticity determined fluctuation regimes in smectic membranes. *Physical review letters*, 91(16), 165504.
- [147] Sikharulidze, I., & de Jeu, W. H. (2005). Dynamics of fluctuations in smectic membranes. *Physical Review E*, 72(1), 011704.
- [148] Maxwell, J. C. (1954). *A Treatise on Electricity and Magnetism Unabridged*. Dover.
- [149] Bartoli, A. (1884). Il calorico raggiante e il secondo principio di termodinamica. *Il Nuovo Cimento* (1877-1894), 15(1), 193-202.
- [150] Bradshaw, D. S., & Andrews, D. L. (2017). Manipulating particles with light: radiation and gradient forces. *European Journal of Physics*, 38(3), 034008.

- [151] Lebedev, P. (1901). The experimental study of the pressure of the light. *Ann. Phys*, 6, 433.
- [152] Nichols, E. F., & Hull, G. F. (1901). A preliminary communication on the pressure of heat and light radiation. *Physical Review (Series I)*, 13(5), 307.
- [153] MacDonald, M. P., Spalding, G. C., & Dholakia, K. (2003). Microfluidic sorting in an optical lattice. *Nature*, 426(6965), 421-424.
- [154] Pauzauskie, P. J., Radenovic, A., Trepagnier, E., Shroff, H., Yang, P., & Liphardt, J. (2006). Optical trapping and integration of semiconductor nanowire assemblies in water. *Nature materials*, 5(2), 97-101.
- [155] Agarwal R, Ladavac K, Roichman Y, Yu GH, Lieber CM, Grier DG. 2005. *Opt. Express* 13:8906–12
- [156] Furst, E. M. (2005). Applications of laser tweezers in complex fluid rheology. *Current opinion in colloid & interface science*, 10(1-2), 79-86.
- [157] Meiners, J. C., & Quake, S. R. (1999). Direct measurement of hydrodynamic cross correlations between two particles in an external potential. *Physical review letters*, 82(10), 2211.
- [158] Henderson, S., Mitchell, S., & Bartlett, P. (2001). Direct measurements of colloidal friction coefficients. *Physical Review E*, 64(6), 061403.
- [159] Henderson, S., Mitchell, S., & Bartlett, P. (2002). Propagation of hydrodynamic interactions in colloidal suspensions. *Physical review letters*, 88(8), 088302.
- [160] Hough, L. A., & Ou-Yang, H. D. (2002). Correlated motions of two hydrodynamically coupled particles confined in separate quadratic potential wells. *Physical Review E*, 65(2), 021906.
- [161] Liphardt, J., Dumont, S., Smith, S. B., Tinoco, I., & Bustamante, C. (2002). Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of Jarzynski's equality. *Science*, 296(5574), 1832-1835.
- [162] Wang, G. M., Sevick, E. M., Mittag, E., Searles, D. J., & Evans, D. J. (2002). Experimental demonstration of violations of the second law of thermodynamics for small systems and short time scales. *Physical Review Letters*, 89(5), 050601.
- [163] Trepagnier, E. H., Jarzynski, C., Ritort, F., Crooks, G. E., Bustamante, C. J., & Liphardt, J. (2004). Experimental test of Hatano and Sasa's nonequilibrium steady-state equality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(42), 15038-15041.
- [164] Collin, D., Ritort, F., Jarzynski, C., Smith, S. B., Tinoco, I., & Bustamante, C. (2005). Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. *Nature*, 437(7056), 231-234.



- [165] Bustamante, C. (2005). Unfolding single RNA molecules: bridging the gap between equilibrium and non-equilibrium statistical thermodynamics. *Quarterly reviews of biophysics*, 38(4), 291-301.
- [166] Bustamante, C., Liphardt, J., & Ritort, F. (2005). The Nonequilibrium Thermodynamics of Small Systems. *Phys. Today*, 58(7), 43.
- [167] Kimura, Y., & Bianco, P. R. (2006). Single molecule studies of DNA binding proteins using optical tweezers. *Analyst*, 131(8), 868-874.
- [168] Nugent-Glandorf, L., & Perkins, T. T. (2004). Measuring 0.1-nm motion in 1 ms in an optical microscope with differential back-focal-plane detection. *Optics letters*, 29(22), 2611-2613.
- [169] Visscher, K., Gross, S. P., & Block, S. M. (1996). Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2(4), 1066-1076.
- [170] Shaevitz, J. W., Abbondanzieri, E. A., Landick, R., & Block, S. M. (2003). Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*, 426(6967), 684-687.
- [171] Meiners, J. C. & Quake, S. R. (2000) *Phys. Rev. Lett.* 84, 5014–5017.
- [172] Goodman, J. W. (2005). *Introduction to Fourier optics*. Roberts and Company Publishers.
- [173] BEA, S., & Teich, M. C. (1991). “*Fundamentals of Photonics*”. Wiley, 313.
- [174] Shaevitz, J. W. (2006). *A practical guide to optical trapping*. University of Washington, 138.
- [175] McDonald, C. (2017). *Applications of Optical Manipulation for Low Cost Implementation, Beam Shaping and Biophysical Force Measurements* (Doctoral dissertation, University of Dundee).
- [176] Lee, W. M., Reece, P. J., Marchington, R. F., Metzger, N. K., & Dholakia, K. (2007). Construction and calibration of an optical trap on a fluorescence optical microscope. *Nature protocols*, 2(12), 3226.
- [177] Dholakia, K., Reece, P., & Gu, M. (2008). Optical micromanipulation. *Chemical Society Reviews*, 37(1), 42-55.
- [178] Fällman, E., & Axner, O. (1997). Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. *Applied Optics*, 36(10), 2107-2113.
- [179] Pacoret, C., & Regnier, S. (2013). Invited article: A review of haptic optical tweezers for an interactive microworld exploration. *Review of Scientific Instruments*, 84(8), 081301.

- [180] Mio, C., Gong, T., Terray, A., & Marr, D. W. M. (2000). Design of a scanning laser optical trap for multiparticle manipulation. *Review of Scientific Instruments*, 71(5), 2196-2200.
- [181] Mangeol, P., & Bockelmann, U. (2008). Interference and crosstalk in double optical tweezers using a single laser source. *Review of Scientific Instruments*, 79(8), 083103.
- [182] Tassieri, M. (Ed.). (2016). *Microrheology with Optical Tweezers: Principles and Applications*. CRC Press.
- [183] Mahajan, V. N. (1998). *Optical imaging and aberrations: Ray geometrical optics (Vol. 45)*. SPIE press.
- [184] Masui, S., Michihata, M., Takamasu, K., & Takahashi, S. (2017, May). Highly sensitive back-focal-plane interferometry for tracking nanoparticle position. In *CLEO: Science and Innovations* (pp. JW2A-10). Optical Society of America.
- [185] Thorlabs (s.f.). *Position Sensing Detectors*. Recuperado desde [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=4400&pn=PDQ80A](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4400&pn=PDQ80A). [Fecha de acceso: 2020].
- [186] Peterman, E. J., Gittes, F., & Schmidt, C. F. (2003). Laser-induced heating in optical traps. *Biophysical journal*, 84(2), 1308-1316.
- [187] Evans, J., Gratzner, W., Mohandas, N., Parker, K., & Sleep, J. (2008). Fluctuations of the red blood cell membrane: relation to mechanical properties and lack of ATP dependence. *Biophysical journal*, 94(10), 4134-4144.
- [188] Selvaraj, S., Mohan, A., Narayanan, S., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2013). Dose-dependent interaction of trans-resveratrol with biomembranes: effects on anti-oxidant property. *Journal of medicinal chemistry*, 56(3), 970-981.
- [189] Neves, A. R., Nunes, C., & Reis, S. (2015). New insights on the biophysical interaction of resveratrol with biomembrane models: relevance for its biological effects. *The journal of physical chemistry B*, 119(35), 11664-11672.
- [190] Neves, A. R., Nunes, C., Amenitsch, H., & Reis, S. (2016). Effects of resveratrol on the structure and fluidity of lipid bilayers: a membrane biophysical study. *Soft matter*, 12(7), 2118-2126.
- [191] Sánchez, S. A., Tricerri, M. A., Gunther, G., & Gratton, E. (2007). Laurdan generalized polarization: from cuvette to microscope. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 2, 1007-1014.
- [192] Jaureguiberry, M. S., Tricerri, M. A., Sanchez, S. A., Finarelli, G. S., Montanaro, M. A., Prieto, E. D., & Rimoldi, O. J. (2014). Role of plasma membrane lipid composition on cellular homeostasis: learning from cell line models expressing fatty acid desaturases. *Acta Biochim Biophys Sin*, 46(4), 273-282.

- [193] Mercer, R. W., & Dunham, P. B. (1981). Membrane-bound ATP fuels the Na/K pump. Studies on membrane-bound glycolytic enzymes on inside-out vesicles from human red cell membranes. *The Journal of general physiology*, 78(5), 547-568.
- [194] Park, Y., Best, C. A., Auth, T., Gov, N. S., Safran, S. A., Popescu, G., Suresh, S., & Feld, M. S. (2010). Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1289-1294.
- [195] Viskupicova, J., Blaskovic, D., Galiniak, S., Soszyński, M., Bartosz, G., Horakova, L., & Sadowska-Bartosz, I. (2015). Effect of high glucose concentrations on human erythrocytes in vitro. *Redox biology*, 5, 381-387.
- [196] Bühler, I., Walter, R., & Reinhart, W. H. (2001). Influence of D-and L-glucose on erythrocytes and blood viscosity. *European journal of clinical investigation*, 31(1), 79-85.
- [197] Reddy, A. S., Warshaviak, D. T., & Chachisvilis, M. (2012). Effect of membrane tension on the physical properties of DOPC lipid bilayer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(9), 2271-2281.
- [198] Fornal, M., Lekka, M., Pyka-Fościak, G., Lebed, K., Grodzicki, T., Wizner, B., & Styczeń, J. (2006). Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 35(1-2), 273-276.
- [199] Chang, H. Y., Li, X., & Karniadakis, G. E. (2017). Modeling of biomechanics and biorheology of red blood cells in type 2 diabetes mellitus. *Biophysical journal*, 113(2), 481-490.
- [200] Mondal, D., Dinda, S., Bandyopadhyay, S. N., & Goswami, D. (2019). Polarization induced control of optical trap potentials in binary liquids. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- [201] Gallardo, M. J., Suwalsky, M., Ramírez, D., Tapia, J., & Sepulveda, B. (2019). Antioxidant effect of resveratrol in single red blood cells measured by thermal fluctuation spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 665, 30-35.
- [202] Tapia, J., Vera, N., Aguilar, J., González, M., Sanchez, S. A., Coelho, P., Saavedra, C., & Staforelli, J. (2020). Correlated flickering of erythrocytes membrane observed with dual time resolved membrane fluctuation spectroscopy under different D-glucose concentrations. Manuscript submitted to *Scientific reports* for publication (submission ID: a8017a66-2aa4-4863-bcb7-bda01a342402). Current status: awaiting peer review.
- [203] Tapia, J., Vera, N., Aguilar, J., Staforelli, J., González, M., Sánchez, S. A., Coelho, P., & Miño, G. (2020, April). Thermal fluctuation spectroscopy apply to red blood cells membrane: the effect of glucose on the micro rheological properties. In *Clinical and Translational Biophotonics* (pp. TW4B-6). Optical Society of America.

- [204] Coelho, P. A., Tapia, J. E., Pérez, F., Torres, S. N., & Saavedra, C. (2017). Infrared light field imaging system free of fixed-pattern noise. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- [205] Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., & Gratton, E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical journal*, 60(1), 179.
- [206] Parasassi, T., & Gratton, E. (1995). Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *Journal of Fluorescence*, 5(1), 59-69.
- [207] Sanchez, S. A., Herlax, V., Lillo, M. P., Sandoval, C., Aguilar, J., & Gunther, G. (2018). Using Laurdan and Spectral Phasor Analysis to Study Erythrocytes Membrane Solubilization. *Biophysical Journal*, 114(3), 99a.
- [208] Fernández-Pérez, E. J., Sepúlveda, F. J., Peters, C., Bascuñán, D., Riffo-Lepe, N. O., González-Sanmiguel, J., Sanchez, S. A., Peoples, R. W., Vicente, B., & Aguayo, L. G. (2018). Effect of cholesterol on membrane fluidity and association of A $\beta$  oligomers and subsequent neuronal damage: A double-edged sword. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 226.
- [209] Sanchez, S. A., Gunther, G., Tricerri, M. A., & Gratton, E. (2011). Methyl- $\beta$ -cyclodextrins preferentially remove cholesterol from the liquid disordered phase in giant unilamellar vesicles. *The Journal of membrane biology*, 241(1), 1-10.

# Apéndice A

## Valores $P$ para correlaciones de Pearson

En la tabla A.1, se presentan los valores  $P$  de las correlaciones de Pearson obtenidas para las concentraciones 5.5, 12.5 y 25 mM de D-glucosa al utilizar diferentes ventanas de tiempo en las señales analizadas.

Ventana de tiempo $t$ (s)	Valor $P$		
	5.5 vs 12.5 mM	5.5 vs 25 mM	12.5 vs 25 mM
0.01	0.0316	< 0.0001	0.0425
0.1	< 0.0001	< 0.0001	0.9929
1	< 0.0001	< 0.0001	0.9773
10	< 0.0001	0.0009	0.7727

Tabla A.1: Valores  $P$  de las correlaciones de Pearson obtenidos para las concentraciones 5.5, 12.5 y 25 mM de D-glucosa utilizando diferentes ventanas de tiempo para las señales analizadas.

# Apéndice B

## Imágenes de polarización generalizada de Laurdan

Laurdan (6-lauroyl,1-2-dimethylamino naphthalene) es una molécula fluorescente usada para detectar cambios en las propiedades de fase de una membrana a través de su sensibilidad a la polaridad del ambiente en la bicapa lipídica [192]. Cambios en la polaridad son mostrados como corrimientos en el espectro de emisión de Laurdan lo cuales son cuantificados mediante el cálculo de la ecuación de polarización generalizada (GP) mostrada en B.1.

$$GP = \frac{I_{\text{azul}} - I_{\text{verde}}}{I_{\text{azul}} + I_{\text{verde}}} \quad (\text{B.1})$$

$I_{\text{azul}}$  y  $I_{\text{verde}}$  corresponden a las intensidades de emisión en aproximadamente 440 y 490 nm, respectivamente. Si Laurdan está dentro de una membrana biológica, su espectro se moverá de acuerdo al contenido de agua en la bicapa lipídica que conforma la membrana. El contenido de agua se correlaciona con el empaquetamiento de lípidos y la fluidez de la membrana. [205, 206]. Para calcular el valor de GP en un microscopio, se necesita la excitación de dos fotones para minimizar el photobleaching (foto-blanqueo) severo del tinte por la excitación de un fotón. De esta forma, se usa una longitud de onda de 780 nm. Las regiones azul y verde del espectro de emisión son obtenidas usando un sistema de detección de dos canales con los filtros correspondientes o con un detector espectral. Esta técnica ha sido usada antes para medir fluidez de membrana en eritrocitos [207], células de mamíferos [208], y liposomas [209].

### B.1. Preparación de la muestra

Los glóbulos rojos humanos (RBCs), se obtuvieron de donantes sanos y se almacenaron a 4 °C. Todo el experimento se realizó el mismo día. Los RBCs se centrifugaron a 4000 rpm (1800 g), se enjuagaron y se suspendieron al hematocrito original (40 % vol/vol) en un buffer (líquido en donde RBCs son suspendidos) de PBS salino. Los RBCs (con un



hematocrito final de 5 % vol/vol) se incubaron durante 24 horas a 37 °C en D-glucosa a tres concentraciones (5.5, 12.5 y 25 mM). Después de la incubación, los RBCs se centrifugaron a 4000 rpm (1800 g) y el *pellet* se enjuagó tres veces con PBS para las mediciones de imágenes de fluorescencia. Los eritrocitos tratados con D-glucosa se diluyeron con PBS a un hematocrito al 0.2 % vol/vol y se incubaron con 1  $\mu$ M de Laurdan durante 1 hora a 37 °C. Para la observación con microscopio, las muestras se depositaron en un plato de microscopio recubierto con polilisina (MatTek Co. Ashland, MA, USA) para permitir la adhesión de los eritrocitos al plato. Las mediciones bajo el microscopio se obtuvieron a temperatura ambiente.

## B.2. Adquisición de datos

Las imágenes de intensidad se obtuvieron en un microscopio Zeiss LSM780 NLO de dos fotones utilizando un objetivo de inmersión en aceite 63X (Plan-Apochromat). Un láser Ti (Sapphire Láser Coherent, Chameleon) con una frecuencia de repetición de 80 MHz, y sintonizado a 780 nm, fue usado para excitar la muestra. Por su parte, la señal de emisión se recibió en dos canales: canal azul (412 – 464 nm) y canal verde (482 – 534 nm). El tamaño de la imagen fue de un área de 134.82  $\mu\text{m}^2$  con 1024×1024 píxeles. Las mediciones se tomaron en el Centro de Microscopía (CMA, Centro de Microscopía Avanzada) de la Universidad de Concepción.

## B.3. Análisis de datos de GP

### B.3.1. Determinación del tamaño de los glóbulos rojos

Para determinar el tamaño de los RBCs, se utilizaron las imágenes de intensidad del canal azul (412 – 464 nm) y el programa ImageJ. Se analizó un total de 112 células.

### B.3.2. Determinación de la fluidez de membrana

Las imágenes GP se obtuvieron aplicando la ecuación B.1 a las imágenes de intensidad y utilizando el programa ImageJ. Se obtuvieron veinticinco conjuntos de imágenes para cada tratamiento y para el control. A partir de la imagen GP, se seleccionaron los píxeles atribuidos a la membrana plasmática (5 píxeles del borde celular exterior) y la distribución del histograma de píxeles [208] fue obtenida y analizada [192, 208]. El análisis del GP promedio entregó la fluidez promedio de la membrana. El histograma de píxeles se ajusta a una distribución Gaussiana, y el centro se informa como el valor medio de GP para la membrana. Se procesan diez imágenes de esta manera, y los valores de  $GP_{\text{promedio}}$ , se grafican en un diagrama de caja donde los parámetros describen una población (mediana y porcentaje de certeza).