



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

Manipulación de micropartículas por ondas evanescentes

Por: Tomás Troncoso Enríquez

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la
Universidad de Concepción para optar al título de Físico

Abril 2025

Concepción, Chile

Profesor Guía: Dr. Juan Pablo Staforelli

Profesor co-Guía: Dr. Ignacio Bordeu

© 2024, Tomás Troncoso Enríquez

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

Dedicado a mi familia.

Agradecimientos

Dado que este es el punto final del camino en la carrera de Ciencias Físicas, me gustaría aprovechar esta instancia para reconocer y agradecer los aportes de toda la gente que ha hecho posible que siquiera haya llegado hasta aquí.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, a mi Madre y Padre, por el apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida y en todas mis decisiones, y sin el cual no me puedo ni siquiera imaginar que sería de mi vida. A mi abuelos, por todo el apoyo y cariño que me han brindado, además de todas las lecciones de vida, las que son parte fundamental de quien soy. A mis hermanos, por su paciencia conmigo y por todos los momentos de compañía que hemos pasados juntos.

A todos mis amigos, los cuales le dan alegría y sentido a mi vida, y siempre han sido una fuente de apoyo emocional fundamental a lo largo de todos estos años; muchas gracias por siempre tener tanta fe en mí, incluso más que yo. Realmente me considero afortunado de haberlos conocido y tenerlos en mi vida.

A mis amigos y compañeros de carrera, con los cuales compartí y trabajé durante estos años y sin los cuales no hubiera sido posible terminar la carrera. Destaco a José Huenchual, por los años que pasamos juntos en el laboratorio, a Pedro Conteras y Gerardo Millar, con quienes formamos lo que fue para mí el núcleo de mi experiencia en Física, tanto a nivel académico como personal, y sin los cuales mi paso por la universidad hubiera sido completamente distinto.

A todos mis profesores, los cuales de forma intencional o no han formado parte de mi formación académica e intelectual, y que a fin de cuentas me entregaron las herramientas con las que interpreto el mundo. En particular, destacar a mis guías de tesis, el Dr. Juan Pablo Staforelli y el Dr. Ignacio Bordeu, por toda la paciencia, apoyo y buena disposición que han tenido conmigo, tanto en cuanto a la confianza para desenvolverme libremente en el laboratorio, como el guiar mi trabajo, incluso cuando yo no veía un camino hacia adelante.

Finalmente, me gustaría agradecer al grupo de materia activa de la universidad de Chile, ya que han sido un aporte importante para el desarrollo de esta tesis, y agradecer a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo por el apoyo financiero durante el desarrollo de este trabajo, a través del proyecto FONDECYT Iniciación 11230941.

Resumen

En esta tesis se implementó un montaje experimental para generar ondas evanescentes con el fin de manipular micropartículas y cuantificar su movimiento mediante el análisis de trayectorias identificadas con software de procesamiento de video. Los resultados experimentales obtenidos para las micropartículas se compararon con los valores derivados de un modelo teóricos, observándose una concordancia significativa entre ambos.

Posteriormente, la metodología desarrollada se aplicó al estudio del desplazamiento de glóbulos rojos. Trabajos anteriores han mostrado que la glucosa puede alterar propiedades mecánicas de la membrana de glóbulos rojos. Para analizar si estos cambios mecánicos tienen o no un efecto significativo en la capacidad de una onda evanescente para transmitir momentum a los glóbulos, se realizaron mediciones bajo distintas concentraciones de glucosa para evaluar su posible efecto en las velocidades registradas, para así determinar si la concentración de glucosa tiene o no un efecto en el desplazamiento de la célula.

Keywords – Ondas Evanescentes, micro-manipulación, Glóbulos rojos

Abstract

This thesis presents an experimental setup designed to generate evanescent waves for optical manipulation of microparticles, coupled with quantitative motion analysis through video-processing software. The experimental results for microparticle trajectories were compared with theoretical predictions from a numerical model, showing significant agreement between both approaches.

Subsequently, the developed methodology was applied to study red blood cell (RBC) displacement. Previous studies have shown that glucose can alter the mechanical properties of red blood cell membranes. To analyze whether these mechanical changes have a significant effect on the ability of an evanescent wave to transfer momentum to the red blood cells, measurements were taken under different glucose concentrations to evaluate their possible effect on the recorded velocities, thereby determining whether glucose concentration has an effect on cell displacement.

Keywords – Evanescent waves, micro-manipulation , red blood cells

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	II
Abstract	III
1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.2. Hipótesis	3
1.2.1. Objetivo general	3
1.2.2. Objetivos específicos	4
2. Marco Teórico	5
2.1. Ondas Evanescentes:	5
2.1.1. Onda electromagnética plana	5
2.1.2. Polarización	7
2.1.3. Radiación electromagnética en la interfaz	8
2.1.4. Ley de Snell	9
2.1.5. Ecuaciones de Fresnel	10
2.1.6. Reflexión Interna total	12
2.1.7. Onda Evanescente	13
2.1.8. Dirección y magnitud del campo de una onda evanescente	15
2.2. Fuerza generada por la onda evanescente sobre una partícula esférica	16
2.3. Manipulación experimental de Micropartículas con ondas evanescentes	21
2.4. Seguimiento de objetos	22
2.5. Ley de Stokes	23
3. Manipulación de Micropartículas	24
3.1. Montaje experimental	24
3.2. Preparación de muestras	27
3.3. Grabación de los videos	29
3.4. Procesamiento de los videos	30
3.5. Análisis de datos	32
3.5.1. Análisis de una sola medición	32
3.5.2. Análisis de múltiples mediciones en el mismo prisma	34

Índice general	v
3.6. Análisis de mediciones para prismas diferentes	35
3.7. Comparación con el modelo teórico	37
3.8. Discusión	40
4. Manipulación de Glóbulos Rojos	42
4.1. Modificaciones con respecto al protocolo anterior	42
4.2. Análisis de las velocidades de los glóbulos	46
4.3. Discusión	48
5. Conclusiones y Perspectivas	51
Referencias	53
Apéndices	56
A.	56
A1. Cálculo del ángulo del espejo en términos del índice de refracción de ambos medios y el ángulo del prisma	56
A2. Coalescencia y ruptura de microgotas	59

Índice de cuadros

2.2.1. Valores de las funciones para el campo $E_i^{(p)}$	18
---------------------------------------------------------------------	----

Índice de figuras

2.1.1. Haz incidente, reflejado y transmitido en la interfaz de dos medios con índices de refracción diferentes	9
2.2.1. Partícula de radio a e índice de refracción n_3 situada a una altura h por sobre la interfaz, inmersa en el campo evanescente generado por un láser con un ángulo de incidencia θ_1	17
3.1.1. Esquema del montaje experimental implementado	25
3.1.2. Imágenes del controlador de ángulo (izquierda), la plataforma para el prisma y el microscopio (centro), y sistema óptico de el microscopio (derecha) implementados en el laboratorio	26
3.1.3. Imágenes de el láser (izquierda), y su controlador (derecha) utilizados en el montaje	26
3.1.4. Relación entre la potencia óptica del láser y el porcentaje de corriente indicada en la caja de control	27
3.2.1. Esquema de la muestra preparada (izquierda) y la muestra preparada en el laboratorio (derecha).	28
3.3.1. Imágenes de las micropartículas de poliestireno suspendidas en agua con la fuente de iluminación (izquierda) e iluminadas por la dispersión de la luz del láser (derecha)	29
3.4.1. Representación visual de todas las trayectorias recorridas por las micropartículas superpuestas sobre el video	32
3.5.1. Histograma de las velocidades registradas por las partículas al ser empujadas por la onda evanescente.	33
3.5.2. Densidades de probabilidad para las velocidades de las partículas estimadas a partir de los histogramas.	34
3.5.3. Densidades de probabilidad para la velocidad extraídas para diferentes muestras en el mismo prisma	35
3.6.1. Densidades de probabilidad para la velocidad medidas para muestras en dos prismas distintos	36
3.6.2. Densidades de probabilidad para la velocidad de las micropartículas, medidas para muestras en dos prismas distintos	36
3.7.1. Medición del área del haz del láser utilizando la regla de Thorcam	38
3.7.2. Gráficos de las velocidades calculadas numéricamente en Matlab para diferentes índices de refracción de las micropartículas, en escala lineal (izquierda) y logarítmica (derecha).	39

4.1.1. Esquema de la muestra de glóbulos preparada (izquierda) y la muestra preparada en el laboratorio (derecha).	43
4.1.2. Imagen de los glóbulos bajo el microscopio con iluminación directa (izquierda) y por dispersión del láser infrarrojo (derecha).	44
4.1.3. Comparación de las distribuciones de probabilidad para las velocidades de las partículas para dos regiones dentro de un mismo prisma.	44
4.1.4. Representación visual de las trayectorias descritas por los glóbulos, superpuestas sobre el video procesado; generada en TrackMate. . .	45
4.2.1. Diagrama de violín para las mediciones de glóbulos rojos a diferentes concentraciones de glucosa y sus respectivos controles	46
4.2.2. Velocidades promedio para las diferentes mediciones realizadas en glóbulos rojos a diferentes concentraciones de glucosa	47
A2.1. Láser sobre una burbuja de aire, el que induce la generación de gotas de agua (izquierda), las que crecen y fusionan (centro) hasta eventualmente colapsar y formar una multitud de gotas de menor tamaño (derecha).	60

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación

Con la invención del microscopio en el siglo XVII por Anton van Leeuwenhoek, se descubrió y adquirió acceso al mundo microscópico, lo que implicó una revolución para la biología, la medicina y el conocimiento humano [1]. Sin embargo, si bien se podían observar estructuras previamente invisibles, al momento de su descubrimiento no existían métodos para manipularlas e interactuar con ellas directamente, por lo que cualquier estudio se limitaba solamente a la observación.

No fue hasta el siglo XX cuando empezaron a desarrollarse las primeras técnicas con la capacidad de intervenir en este mundo anteriormente inaccesible. Uno de los primeros ejemplos de manipulación microscópica directa corresponde al trabajo del doctor Marsall Barber, que en 1904 logro exitosamente la microinyección de bacterias en células, utilizando una metodología experimental que permitía un preciso control de la posición de la jeringa y de la cantidad de liquido inyectado [2].

A lo largo del resto del siglo, debido al desarrollo de instrumentación y técnicas de fabricación cada vez más refinadas, un gran número de metodologías experimentales para la interacción directa con objetos individuales a la escala microscópica se desarrollaron en paralelo, tales como la microinyección, la aspiración por micropipeta, la técnica de patch clamp, microscopía de fuerza atómica, pinzas magnéticas, entre otras [3]. Dentro de estas metodologías, se encuentran los métodos por manipulación por fuerzas ópticas, las cuales se aprovechan de la

capacidad de la radiación electromagnética para transferir momentum y por lo tanto empujar objetos microscópicos.

Si bien se sabe que la luz es capaz de transmitir momentum desde el desarrollo de la teoría electromagnética de Maxwell, no es hasta la invención del láser en la década de 1960 que se abrió la puerta a la concentración de haces de luz altamente direccionales en áreas extremadamente reducidas, lo que abrió la posibilidad de utilizar el momentum intrínseco de la luz para la manipulación de objetos en la escala micrométrica [4].

Finalmente, es Arthur Askin y su equipo en los años 70 los que realizaron las primeras pruebas experimentales de manipular micropartículas mediante radiación electromagnética. Desde entonces, la manipulación de microsistemas por medio de luz se ha extendido considerablemente a un gran número de disciplinas, desde la biología, la química y múltiples áreas de la física [4, 5].

Dos de las metodologías más relevantes desarrolladas a partir de estas técnicas son las pinzas ópticas y las ondas evanescentes. Las pinzas ópticas consisten en utilizar luz extremadamente enfocada para contener y desplazar partículas [6]. Por otro lado, las ondas evanescentes son un tipo de onda electromagnética estacionaria que se produce en la interfaz de una reflexión interna total. Estas ondas decaen exponencialmente en intensidad a lo largo del medio y oscilan en la dirección de propagación del láser [7, 8].

En particular, las ondas evanescentes han encontrado una gran cantidad de aplicaciones en áreas relacionadas a la biología, como la microscopía de fluorescencia por reflexión interna total (TIR-FM), que permite observar superficies celulares con una resolución y relación señal-ruido (SNR) extremadamente altas [9]. También se utilizan en una multitud de sensores que utilizan la onda evanescente para la estimular la fluorescencia en el sistema que se está controlando [10]. Entre estas aplicaciones, la capacidad que tienen las ondas evanescentes de empujar objetos microscópicos en la dirección de propagación del láser que las genera ha permitido utilizarlas de forma exitosa para manipular tanto partículas inertes como células [8, 11]. En particular algunas de las ventajas de utilizar ondas evanescentes corresponden a:

- La facilidad de implementar un montaje experimental, lo que además permite la sencilla modificación e implementación de más elementos al montaje.

- Presentan una baja invasividad, debido a que no modifican significativamente el objeto de estudio.
- Su capacidad de afectar globalmente a la muestra de estudio, en vez de actuar sobre elementos individuales.
- Su versatilidad, ya que se pueden utilizar para manipular un gran número de sistemas.

Debido al interés en el estudio de técnicas de manipulación óptica y su aplicación en microbiología, este trabajo busca diseñar, implementar y validar un montaje experimental que permita la utilización de ondas evanescentes para la manipulación de micropartículas. Para esto, se desarrollará una metodología de laboratorio para la preparación de muestras, la extracción de información sobre su movimiento y el posterior análisis e interpretación de los datos recolectados. Estos resultados se compararán con un modelo teórico que permita obtener la velocidad esperada de las micropartículas.

Una vez establecida la metodología de medición, se planea extender su aplicación al estudio de glóbulos rojos, con el fin de darle una relevancia científica adicional al método propuesto. Este enfoque permitirá aplicar las técnicas desarrolladas a sistemas biológicos que han sido estudiados anteriormente en el laboratorio.

1.2. Hipótesis

Las fuerzas ópticas generadas por ondas evanescentes permiten la manipulación de múltiples micropartículas simultáneamente, usando su desplazamiento en la dirección de propagación del láser, el cual es cuantificable mediante el uso de técnicas de seguimiento óptico. Al aplicar esta metodología al análisis de glóbulos rojos en medios con distintas concentraciones de glucosa, se espera observar una relación inversamente proporcional entre la velocidad de desplazamiento de los eritrocitos y la concentración de glucosa en el medio, atribuible a cambios en las propiedades mecánicas de la membrana celular.

1.2.1. Objetivo general

Desarrollar un montaje experimental y metodología que permita la utilización y cuantificación de las fuerzas generadas por medio de ondas evanescentes, cuyos

resultados sean comparables con un modelo teórico sobre las fuerzas esperadas y que se pueda aplicar al estudio de microsistemas biológicos de interés.

1.2.2. Objetivos específicos

- Implementar un montaje experimental que permita la generación de ondas evanescentes.
- Lograr empujar micropartículas de polietileno por medio de estas ondas evanescentes.
- Establecer una metodología para la cuantificación del movimiento de estas micropartículas.
- Comparar los resultados obtenidos de las mediciones experimentales con un modelo teórico sobre las magnitudes de las velocidades medidas.
- Aplicar el protocolo desarrollado para micropartículas al estudio del movimiento de glóbulos rojos a diferentes concentraciones de glucosa.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Ondas Evanescentes:

2.1.1. Onda electromagnética plana

Para una adecuada cuantificación de la onda evanescente, es fundamental comprender cómo la radiación electromagnética surge como una consecuencia natural de las ecuaciones de Maxwell, y como esta da origen a la onda evanescente en la interfaz entre dos medios, debido a las condiciones que dichas ecuaciones imponen sobre los campos eléctrico y magnético [12]. Con este objetivo, lo primero es considerar las ecuaciones de Maxwell para un medio homogéneo y libre de carga:

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = 0 \quad (2.1.1)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (2.1.2)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} = 0 \quad (2.1.3)$$

$$\nabla \times \mathbf{B} - \mu\varepsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} = 0, \quad (2.1.4)$$

donde \mathbf{B} y \mathbf{E} corresponden al campo magnético y eléctrico respectivamente; μ corresponde a la constante de permeabilidad magnética del medio, y ε a su permitividad eléctrica.

Estas constantes se relacionan con sus contrapartes del vacío de la siguiente forma:

$$\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_0 \quad (2.1.5)$$

$$\mu = \mu_r \mu_0 \quad (2.1.6)$$

donde μ_0 y ε_0 son los valores de las constantes en el vacío y μ_r y ε_r se conocen como las permeabilidades y permitividad relativas, las cuales son cantidades adimensionales que contienen la información de cómo cierto medio modifica los valores de μ y ε con respecto al vacío.

A partir de las ecuaciones de Maxwell en esta forma, mediante manipulación matemática se puede llegar a las siguientes expresiones para los campos:

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \mu \varepsilon \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} \quad (2.1.7)$$

$$\nabla^2 \mathbf{B} = \mu \varepsilon \frac{\partial^2 \mathbf{B}}{\partial t^2} \quad (2.1.8)$$

Las cuales corresponden a una ecuación de onda, con la cantidad $c = \frac{1}{\sqrt{\mu \varepsilon}}$ siendo la velocidad de la onda electromagnética en el medio correspondiente. Esta velocidad se puede expresar en términos de la velocidad de la luz en el vacío como:

$$c = \frac{1}{\sqrt{\mu \varepsilon}} = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_r \varepsilon_0 \mu_r \mu_0}} = \frac{c_0}{\sqrt{\varepsilon_r \mu_r}}, \quad (2.1.9)$$

Donde c_0 corresponde a la velocidad de la luz en el vacío y $n = \sqrt{\varepsilon_r \mu_r}$ se conoce como el índice de refracción del medio, el cual cuantifica como este medio afecta la velocidad de propagación de la onda.

Luego, dada la forma de las ecuaciones, se tiene que las soluciones para el campo eléctrico y magnético son de la forma:

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_0 e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{x} - i\omega t} \quad (2.1.10)$$

$$\mathbf{B}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{B}_0 e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{x} - i\omega t} \quad (2.1.11)$$

Las cuales corresponden a una onda plana, donde ω es la frecuencia angular de la onda, \mathbf{B}_0 y \mathbf{E}_0 son la amplitud y dirección de los campos eléctrico y magnético, y $\mathbf{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \hat{\mathbf{k}}$ el vector de onda, el cual contiene la dirección de propagación de la onda plana, dada por $\hat{\mathbf{k}}$.

Además, utilizando las mismas ecuaciones de Maxwell, es posible identificar la siguiente relación entre el campo eléctrico y magnético para una onda plana[12]:

$$\mathbf{B}(\mathbf{x}, t) = \frac{1}{c} \hat{\mathbf{k}} \times \mathbf{E}(\mathbf{x}, t) \quad (2.1.12)$$

Esta expresión encapsula varias relaciones fundamentales de una onda plana. En primer lugar, establece que la magnitud del campo magnético está relacionada con la del campo eléctrico mediante $|\mathbf{B}| = \frac{1}{c} |\mathbf{E}|$, por lo que la magnitud de uno de ellos se puede describir completamente en términos del otro. Segundo, muestra de forma sencilla que los campos eléctrico y magnético son mutuamente ortogonales entre sí y, a su vez, perpendiculares a la dirección de propagación de la onda. Estos dos hechos demuestran que, en una onda plana, el campo magnético queda totalmente definido por el campo eléctrico. Por consiguiente, basta con caracterizar el campo eléctrico para describir y manipular de manera completa la onda electromagnética.

2.1.2. Polarización

Como se estableció en la sección anterior, los campos eléctrico y magnético de una onda plana presentan una orientación espacial que puede ser arbitraria, siempre y cuando sean perpendiculares entre sí y a la dirección de propagación $\hat{\mathbf{k}}$. Esta orientación del campo eléctrico define lo que se conoce como la polarización de la onda electromagnética.

Si bien existen múltiples estados posibles de polarización para una onda, tales como estar despolarizada, la polarización elíptica, la circular, entre otros, para los propósitos de este trabajo se consideraran únicamente polarizaciones lineales, las cuales corresponden al caso donde la dirección del campo eléctrico se mantiene constante en el tiempo. En particular, hay dos tipos de polarización lineal que son de interés, las polarizaciones p y s , las que se definen en términos de su relación con el plano incidente, que corresponde al plano que contiene al haz de luz y al vector normal de la superficie sobre la que este rayo incide. Específicamente, la polarización p se refiere al caso en el que el campo eléctrico es paralelo a este plano, o dicho de otra forma, cuando este pertenece a él; en cambio, la polarización s se refiere al caso en el que el campo eléctrico es perpendicular al plano que contiene a $\hat{\mathbf{k}}$, por lo que el campo eléctrico sale de este plano.

2.1.3. Radiación electromagnética en la interfaz

Ahora que se tiene una descripción matemática para la radiación electromagnética correspondiente a una onda plana propagándose por un medio isotrópico libre de carga, se puede proceder a caracterizar cómo esta se ve afectada justo en la interfaz entre dos medios. Para esto, lo primero que haremos será darle una expresión matemática al campo electromagnético incidente a la superficie, sin considerar alguna polarización en particular:

$$\mathbf{E}_I(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{I0} e^{i\mathbf{k}_I \cdot \mathbf{x} - i\omega t} \quad (2.1.13)$$

Luego, una vez que la onda electromagnética interactúa con la interfaz, cierta componente \mathbf{k}_R de esta se mantendrá en el medio original, que se conoce como la parte reflejada, y cierto componente \mathbf{k}_T atravesará al otro medio, que corresponde a la parte transmitida.

Estas dos partes se describen matemáticamente con las siguientes expresiones:

$$\mathbf{E}_R(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{R0} e^{i\mathbf{k}_R \cdot \mathbf{x} - i\omega t} \quad (2.1.14)$$

$$\mathbf{E}_T(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{T0} e^{i\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{x} - i\omega t} \quad (2.1.15)$$

De momento, tanto las magnitudes de los campos resultantes como sus vectores de onda son desconocidas, lo que se puede observar visualmente en la figura 2.1.1.

Para comprender cómo los campos reflejados y transmitidos se relacionan con el incidente, es necesario recurrir a las condiciones que imponen las ecuaciones de Maxwell sobre los distintos campos en la interfaz.

En particular, las ecuaciones de Maxwell imponen que los componentes tangenciales a la interfaz sean continuos y que los componentes normales presenten una discontinuidad, de manera tal que el componente normal a un lado de la ecuación multiplicado por su constante dieléctrica sea el mismo que el campo del otro lado multiplicado por su constante dieléctrica. Con eso se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones [12]:

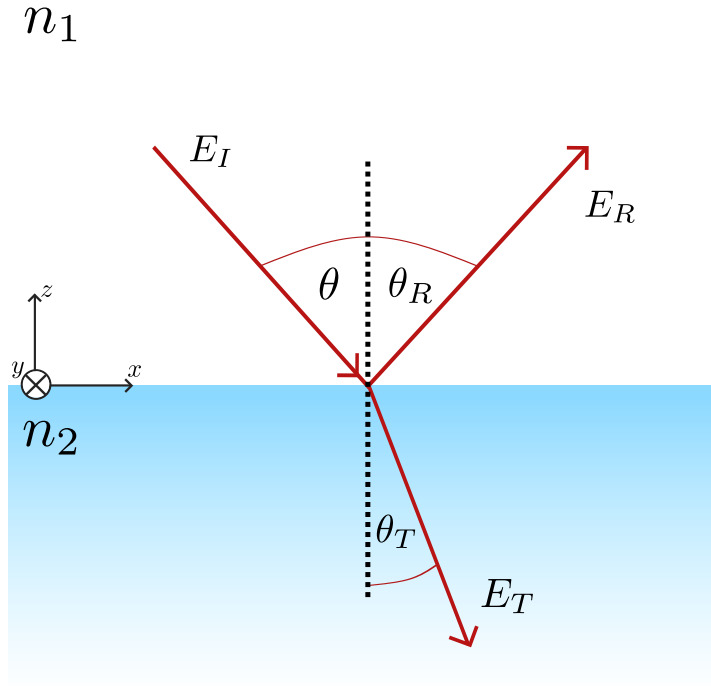


Figura 2.1.1: Haz incidente, reflejado y transmitido en la interfaz de dos medios con índices de refracción diferentes

$$(\varepsilon_1 (\mathbf{E}_I + \mathbf{E}_R) - \varepsilon_2 \mathbf{E}_T) \cdot \hat{n} = 0 \quad (2.1.16)$$

$$(n_1 \mathbf{k}_I \times \mathbf{E}_I + n_1 \mathbf{k}_R \times \mathbf{E}_R - n_2 \mathbf{k}_T \times \mathbf{E}_T) \cdot \hat{n} = 0 \quad (2.1.17)$$

$$(\mathbf{E}_I + \mathbf{E}_R - \mathbf{E}_T) \times \hat{n} = 0 \quad (2.1.18)$$

$$(n_1 \mathbf{k}_I \times \mathbf{E}_I + n_1 \mathbf{k}_R \times \mathbf{E}_R - n_2 \mathbf{k}_T \times \mathbf{E}_T) \times \hat{n} = 0, \quad (2.1.19)$$

donde n_1 y n_2 corresponden a los índices de refracción de cada medio.

2.1.4. Ley de Snell

El primer detalle a considerar de estas ecuaciones, es que debido a que los campos son todos de la forma $\mathbf{E}_{i0} e^{i\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{x} - i\omega t}$, todos presentan una fase compleja, dada por el componente $e^{i\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{x} - i\omega t}$, por lo tanto, para que estas ecuaciones sean consistentes es necesario que esta fase sea constante sobre toda la superficie, y por lo tanto obedezcan la siguiente relación:

$$(i\mathbf{k}_I \cdot \mathbf{x} - i\omega t)_{z=0} = (i\mathbf{k}_R \cdot \mathbf{x} - i\omega t)_{z=0} = (i\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{x} - i\omega t)_{z=0} \quad (2.1.20)$$

Luego, debido a que las tres ondas poseen la misma frecuencia, la expresión anterior se puede reducir a:

$$\frac{\sin(\theta)}{\lambda_I} = \frac{\sin(\theta_R)}{\lambda_R} = \frac{\sin(\theta_T)}{\lambda_T}, \quad (2.1.21)$$

donde f es la frecuencia de la onda y λ_n la longitud de onda en el medio. Luego, como $f\lambda_n = c_n$ y $c_n = c_0/n$ se tiene que:

$$n_1 \sin(\theta) = n_1 \sin(\theta_R) = n_2 \sin(\theta_T) \quad (2.1.22)$$

Que corresponden a 2 relaciones importantes. La primera, entre el ángulo incidente θ y el reflejado θ_R indica que estos dos ángulos deben ser el mismo, lo que corresponde a la ley de reflexión de la luz; Mientras tanto, la relación entre el ángulo incidente θ y el transmitido θ_T corresponde a la ley de Snell, y por lo tanto, de esta condición de fase en la interfaz se deducen dos de las leyes fundamentales de la óptica.

2.1.5. Ecuaciones de Fresnel

Una vez resueltas las condiciones de fase sobre los campos, lo que resta es identificar la relación que existe entre las magnitudes de los campos reflejados y transmitidos con el del incidente; para esto, se definen los coeficientes de transmisión y reflexión, que relacionan las intensidades de la siguiente forma:

$$r = \frac{E_R}{E_I} \quad (2.1.23)$$

$$t = \frac{E_T}{E_I} \quad (2.1.24)$$

Donde E_I , E_R y E_T corresponden a las magnitudes del campo incidente, reflejado y transmitido, respectivamente; estos coeficientes r y t resultan ser de utilidad ya que permiten obtener de manera rápida los valores de magnitud de los campos resultantes simplemente conociendo el campo incidente. Por lo tanto, para identificar a qué corresponden estos valores r y t en términos de los parámetros de la onda incidente, utilizaremos las restricciones sobre los campos encontradas en las ecuaciones (2.1.16) a (2.1.19).

Debido a que estas ecuaciones imponen condiciones diferentes para los componentes

tangenciales y normales al campo de incidencia, los coeficientes resultantes del análisis van a ser diferentes para las polarizaciones s y p , y por lo tanto, es necesario tratar estos casos de forma diferente. Para la polarización s , se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$E_I + E_R - E_T = 0 \quad (2.1.25)$$

$$n_1(E_I - E_R) \cos(\theta) - n_2 E_T \cos(\theta_T) = 0, \quad (2.1.26)$$

que corresponde a un sistema de ecuaciones para E_R y E_T , y si despejamos estas variables y dividimos el resultado final por E_I obtenemos los coeficientes t y r para la polarización s , que son de la forma:

$$r^s = \frac{n_1 \cos(\theta) - \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}}{n_1 \cos(\theta) + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}} \quad (2.1.27)$$

$$t^s = \frac{2n_1 \cos(\theta)}{n_1 \cos(\theta) + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}}. \quad (2.1.28)$$

De forma equivalente, realizando el mismo procedimiento para la polarización p arroja las siguientes ecuaciones:

$$(E_I + E_R) \cos(\theta) - E_T \cos(\theta_T) = 0 \quad (2.1.29)$$

$$n_1(E_I - E_R) - n_2 E_T = 0, \quad (2.1.30)$$

que tienen como solución los siguientes valores para r^p y t^p :

$$r^p = -\frac{n_2^2 \cos(\theta) - n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}}{n_2^2 \cos(\theta) + n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}} \quad (2.1.31)$$

$$t^p = \frac{2n_1 n_2 \cos(\theta)}{n_2^2 \cos(\theta) + n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}}. \quad (2.1.32)$$

Estas ecuaciones para los coeficientes r^s , r^p , t^s y t^p son las llamadas ecuaciones de Fresnel.

Además de estas cantidades, resulta de interés tanto teórico como experimental la relación que existe entre la potencia óptica incidente con la que finalmente se refleja o transmite; estas relaciones se conocen como la reflectancia y transmitancia de la interfaz, y puesto que la potencia óptica depende del cuadrado del campo, tenemos que la reflectancia se puede calcular de forma sencilla de la siguiente

manera:

$$R = \frac{|E_R|^2}{|E_I|^2} = |r|^2 \quad (2.1.33)$$

Luego, por conservación de la energía, la suma de las potencias reflejadas y transmitidas de $E_R + E_T$ debe ser igual a la potencia del haz incidente E_I , y por lo tanto, la transmitancia es sencillamente $T = 1 - R$.

2.1.6. Reflexión Interna total

El paso siguiente para caracterizar la onda evanescente corresponde a describir matemáticamente la reflexión total interna, para esto, consideramos el caso en que el haz de luz va de un medio con mayor índice de refracción a uno de menor índice, tal que $n_1 > n_2$, tal que el ángulo de incidencia sea θ_1 y el transmitido como θ_2 . Luego, de la Ley de Snell se tiene que:

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2) \quad (2.1.34)$$

y despejando el valor de θ_2 se obtiene que:

$$\theta_2 = \sin^{-1} \left(\frac{n_1}{n_2} \sin(\theta_1) \right) \quad (2.1.35)$$

Donde se nota claramente que esta expresión tiene soluciones reales para el ángulo transmitido θ_2 mientras que la expresión $\frac{n_1}{n_2} \sin(\theta_1)$ sea menor que uno, lo que ocurre justamente cuando $\sin(\theta_1) = \frac{n_2}{n_1}$. El valor del ángulo θ_1 que cumple esta propiedad se conoce como el ángulo crítico, y depende únicamente de la relación entre índices de refracción de ambos medios.

Si bien matemáticamente no hay soluciones reales para el ángulo θ_2 cuando $\theta_1 > \theta_c$, al tomar valores de θ_1 mayores, lo que ocurre es que la transmisión del haz de luz cesa completamente, y solamente sobrevive el componente reflejado del haz incidente.

En los coeficientes de Fresnel, cuando $\theta_1 = \theta_c$, se obtiene que el término $\sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}$, se vuelve cero trivialmente, y por lo tanto el coeficiente r se convierte directamente en uno, y por lo tanto la reflectancia también se vuelve uno y la transmitancia 0.

Para el caso donde $\theta_1 > \theta_c$ tenemos que el término $\sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}$ se vuelve imaginario, y por lo tanto los coeficientes de reflexión para ambas polarizaciones toman la siguiente forma:

$$r^{s,p} = \frac{A - iB}{A + iB} \quad (2.1.36)$$

Si bien esto complejiza la relación entre los campos incidentes y reflejados, la relación entre la potencia reflejada y transmitida sigue siendo la misma, esto se puede ver utilizando la ecuación para la reflectancia que muestra que la totalidad de la potencia óptica es reflejada:

$$R = |r|^2 = \frac{A^2 + B^2}{A^2 + B^2} = 1, \quad (2.1.37)$$

de donde se desprende que la transmitancia $T = 0$, por lo que la reflexión interna total ocurre para cualquier ángulo θ_1 por sobre el ángulo crítico.

2.1.7. Onda Evanescente

Si bien el hecho de que no haya transmisión de potencia óptica al otro lado de la interfaz puede inducir a pensar de que no debería existir un campo electromagnético transmitido, puesto que no existen soluciones para el ángulo θ_2 . Sin embargo, si se considera que el valor de $\sin(\theta_2)$ puede tomar valores mayores a 1 cuando el ángulo incidente se encuentra por sobre el ángulo crítico, resulta que es posible encontrar una expresión para el campo transmitido.

Para lograr esto, se analizará cómo el valor de $\sin(\theta_2)$ afecta la componente exponencial $e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{x} - i\omega t}$ del campo \mathbf{E}_T ; en particular, conviene centrar el análisis en el producto punto entre \mathbf{k}_T y \mathbf{x} , ya que corresponde al término que contiene $\sin(\theta_2)$. Luego, utilizando el sistema de referencia definido en la figura 2.1.1, el

producto punto $\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{x}$ corresponde a:

$$\mathbf{k}_T \cdot \mathbf{x} = (k_x x + k_z z) \quad (2.1.38)$$

$$= \frac{2\pi}{\lambda_T} (x \sin(\theta_2) + z \cos(\theta_2)) \quad (2.1.39)$$

$$= \frac{2\pi}{\lambda_0/n_2} \left(x \frac{n_1}{n_2} \sin(\theta_1) + z \sqrt{1 - \sin^2(\theta_2)} \right) \quad (2.1.40)$$

$$= \frac{2\pi}{\lambda_0/n_1} x \sin(\theta_1) + z \frac{2\pi}{\lambda_0} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_1)} \quad (2.1.41)$$

$$= k_I x \sin(\theta_1) + k_0 z \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_1)}, \quad (2.1.42)$$

donde λ_0 corresponde a la longitud de onda en el vacío y $k_n = \frac{2\pi}{\lambda_n}$ representa la magnitud del vector de onda en cierto medio, además, puesto que estamos en el régimen supercrítico ($\theta > \theta_c$), se tiene que $n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_1) < 0$, por lo que se puede factorizar la unidad imaginaria de la raíz tal que el valor del argumento sea siempre real. Finalmente, para simplificar la notación, el ángulo θ_1 pasará a θ , ya que es el ángulo de interés, y k_I pasará a llamarse k_1 ya que corresponde al vector de onda del medio con índice de refracción n_1 . Finalmente, reemplazando el cálculo anterior en la expresión para el campo transmitido se obtiene:

$$\mathbf{E}_T(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_{T0} e^{-i\omega t} e^{ik_1 x \sin(\theta)} e^{-k_0 z \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2}}. \quad (2.1.43)$$

De esta expresión se pueden extraer un gran número de propiedades de una onda evanescente; primero, tenemos que su frecuencia corresponde a la misma que la asociada a la onda que la produce; luego, tenemos que su propagación espacial no depende de las propiedades ópticas del medio en el que se encuentra, sino que es dependiente de las características del medio donde se produce la reflexión, lo que se aprecia claramente en el término $e^{ik_1 x \sin(\theta)}$; y finalmente, se tiene que la magnitud de este campo decae de forma exponencial a lo largo de la dirección normal a la interfaz. En este contexto, una cantidad útil en la manipulación de las ondas evanescentes es la llamada distancia de penetración, la cual corresponde al valor de z en el que la parte exponencial alcanza un valor de $1/e$, o alrededor de un 37% de su valor máximo. Esta distancia toma el valor:

$$d_p = \frac{1}{k_0 \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2}}.$$

En concreto, esta cantidad es útil porque nos permite aproximar la distancia sobre la interfaz en la que la influencia de la onda evanescente debería ser significativa.

2.1.8. Dirección y magnitud del campo de una onda evanescente

Si bien se logró caracterizar exitosamente la parte exponencial del campo eléctrico para una onda evanescente, también es necesario saber la magnitud de éste y cómo se orienta espacialmente, lo que corresponde a analizar la forma que tiene el vector \mathbf{E}_T . Para esto, recurriremos a los coeficientes de Fresnel que fueron calculados anteriormente, además de analizar cómo la polarización afecta a las componentes de la onda evanescente.

Primero, para la polarización s , debido a que el campo tiene solamente un componente normal al plano incidente, que corresponde al eje y en el sistema de referencia utilizado, el campo de la onda evanescente también tiene solamente un componente en el eje y . Luego, debido a que nos interesa caracterizar el campo transmitido en términos del incidente, por conveniencia en la notación redefinimos la magnitud del campo incidente E_I como E_0 ; utilizando los coeficientes de Fresnel descritos en la ecuación (2.1.28), los componentes del vector \mathbf{E}_T de la onda evanescente son:

$$E_{Tx} = 0 \quad (2.1.44)$$

$$E_{Ty} = \frac{2n_1 \cos(\theta)}{n_1 \cos(\theta) + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}} E_0 \quad (2.1.45)$$

$$E_{Tz} = 0 \quad (2.1.46)$$

Notamos que debido a que $\sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}$ toma un valor imaginario cuando se produce la onda evanescente, tenemos que el campo transmitido posee una diferencia de fase con el campo incidente.

Luego, siguiendo un procedimiento similar para la polarización p , con la diferencia que esta tiene componentes del campo en el eje x y z , se obtienen los siguientes

valores para el campo transmitido en el caso de la polarización p :

$$E_{Tx} = \frac{2n_1 \cos(\theta) \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}}{n_2^2 \cos(\theta) + n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}} E_0 \quad (2.1.47)$$

$$E_{Ty} = 0 \quad (2.1.48)$$

$$E_{Tz} = \frac{2n_1^2 \cos(\theta) \sin(\theta)}{n_2^2 \cos(\theta) + n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta)}} E_0, \quad (2.1.49)$$

y al igual que en el caso de la polarización s , tenemos que hay una diferencia de fase entre el campo incidente y el de la onda evanescente, además de una diferencia de fase entre las diferentes componentes del campo.

2.2. Fuerza generada por la onda evanescente sobre una partícula esférica

Dado que ya se tiene una caracterización detallada de la onda evanescente, el siguiente paso de interés para los propósitos de este trabajo es el poder caracterizar cómo esta onda interactúa con una partícula que se encuentre dentro del medio transmitido, y en particular, cuáles son las fuerzas que la onda genera sobre dicha partícula. Con este objetivo se han desarrollado una multitud de modelos con que tienen como objetivo calcular las fuerza que genera una onda evanescente sobre una partícula esférica, tales como el scattering de Mie, la aproximación dipolar, la óptica de rayos, entre otras [13]. Todos estos modelos fueron desarrollados con ciertos regímenes en mente, en los cuales su aplicación resulta más adecuada, dependiendo de la naturaleza del sistema particular a estudiar. Para los propósitos de este trabajo, se utilizara el modelo desarrollado por Almaas y Brevik [14], debido a que la situación y parámetros físicos son extremadamente similares a los estudiados en este trabajo, además de que el modelo es presentado de forma tal que su cálculo computacional es fácil de implementar.

En particular, el modelo estudia la fuerza producida por el campo evanescente sobre una micropartícula que se encuentra por sobre la interfaz. La situación física detallada se puede observar la figura 2.2.1.

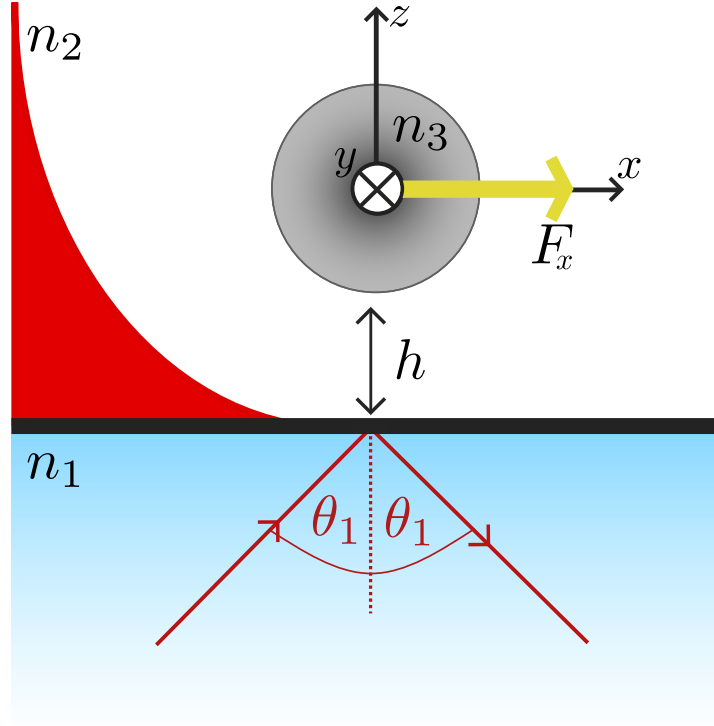


Figura 2.2.1: Partícula de radio a e índice de refracción n_3 situada a una altura h por sobre la interfaz, inmersa en el campo evanescente generado por un láser con un ángulo de incidencia θ_1 .

Para el cálculo de la fuerza, el trabajo [14] comienza realizando un análisis para un campo arbitrario en el medio n_2 , y expresándolo en términos de los armónicos esféricos, debido a que la simetría característica del problema simplifica los cálculos. A partir de este análisis se obtienen las siguientes expresiones para los componentes de los campos eléctrico y magnético en coordenadas esféricas:

$$E_r^{(p)} = \frac{E_0}{\tilde{r}^2} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l l(l+1) K_{lm} z_l(\alpha \tilde{r}) Y_{lm} \quad (2.2.1)$$

$$E_{\theta}^{(p)} = \frac{\alpha E_0}{\tilde{r}} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left[K_{lm} z_l'(\alpha \tilde{r}) \frac{\partial Y_{lm}}{\partial \theta} - \frac{m}{n_2} \tilde{K}_{lm} z_l(\alpha \tilde{r}) \frac{Y_{lm}}{\sin \theta} \right] \quad (2.2.2)$$

$$E_{\phi}^{(p)} = \frac{\alpha E_0}{\tilde{r}} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left[im K_{lm} z_l'(\alpha \tilde{r}) \frac{Y_{lm}}{\sin \theta} - \frac{i}{n_2} \tilde{K}_{lm} z_l(\alpha \tilde{r}) \frac{\partial Y_{lm}}{\partial \theta} \right], \quad (2.2.3)$$

$$B_r^{(p)} = \frac{B_0}{\tilde{r}^2} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l l(l+1) \tilde{K}_{lm} z_l(\alpha \tilde{r}) Y_{lm} \quad (2.2.4)$$

$$B_{\theta}^{(p)} = \frac{\alpha B_0}{\tilde{r}} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left[\tilde{K}_{lm} z_l'(\alpha \tilde{r}) \frac{\partial Y_{lm}}{\partial \theta} + mn_2^2 K_{lm} z_l(\alpha \tilde{r}) \frac{Y_{lm}}{\sin \theta} \right] \quad (2.2.5)$$

$$B_{\phi}^{(p)} = \frac{\alpha B_0}{\tilde{r}} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left[im \tilde{K}_{lm} z_l'(\alpha \tilde{r}) \frac{Y_{lm}}{\sin \theta} + in_2^2 K_{lm} z_l(\alpha \tilde{r}) \frac{\partial Y_{lm}}{\partial \theta} \right], \quad (2.2.6)$$

donde $\alpha = k_2 a$, $\tilde{r} = r/a$ y Y_{lm} son los armónicos esféricos. Además, las funciones K_{lm} , \tilde{K}_{lm} y $z_l(x)$ dependen del superíndice p , el cual indica si estamos considerando el campo incidente sobre la esfera o el dispersado por esta, y que se pueden resumir en la tabla 2.2.1.

Campo	p	K_{lm}	\tilde{K}_{lm}	$z_l(\mathbf{x})$
incidente	i	A_{lm}	B_{lm}	$\psi_l(x)$
dispersado	s	a_{lm}	b_{lm}	$\xi_l^{(1)}(x)$

Cuadro 2.2.1: Valores de las funciones para el campo $E_i^{(p)}$

Donde la funciones $\psi_l(x)$ y $\xi_l^{(1)}(x)$ son:

$$\psi_l(x) = \sqrt{\frac{\pi x}{2}} J_{\nu}(x) \quad (2.2.7)$$

$$\xi_l^{(1)}(x) = \sqrt{\frac{\pi x}{2}} H_{\nu}^{(1)}(x) \quad (2.2.8)$$

con $\nu = l+1/2$, J_{ν} las funciones ordinarias de Bessel y $H_{\nu}^{(1)}$ las funciones ordinarias de Hankel. Luego, los coeficientes A_{lm} y B_{lm} vienen dados por:

$$A_{lm} = \frac{(b/a)^2}{E_0 l(l+1) \psi_l(k_2 b)} \int_{\Omega} E_r^{(i)}(b, \theta, \phi) Y_{lm}^*(\theta, \phi) d\Omega \quad (2.2.9)$$

$$B_{lm} = \frac{(b/a)^2}{B_0 l(l+1) \psi_l(k_2 b)} \int_{\Omega} B_r^{(i)}(b, \theta, \phi) Y_{lm}^*(\theta, \phi) d\Omega, \quad (2.2.10)$$

Donde b corresponde al radio sobre el cual integramos el campo alrededor de la partícula. De su expresión matemática se ve claramente que son estos coeficientes

los que contienen la información del campo incidente con el que interactúa la partícula. Finalmente, los coeficientes a_{lm} y b_{lm} corresponden a los asociados al campo dispersado por la micropartícula, y por lo tanto, utilizando las condiciones de borde para los campos alrededor de la partícula, estos se pueden escribir como:

$$a_{lm} = \frac{\psi_l(\alpha)\psi'_l(\bar{n}_{32}\alpha) - \bar{n}_{32}\psi_l(\bar{n}_{32}\alpha)\psi'_l(\alpha)}{\bar{n}_{32}\psi_l(\bar{n}_{32}\alpha)\xi_l^{(1)'}(\alpha) - \xi_l^{(1)}(\alpha)\psi'_l(\bar{n}_{32}\alpha)} A_{lm} \quad (2.2.11)$$

$$b_{lm} = \frac{\bar{n}_{32}\psi_l(\alpha)\psi'_l(\bar{n}_{32}\alpha) - \psi_l(\bar{n}_{32}\alpha)\psi'_l(\alpha)}{\psi_l(\bar{n}_{32}\alpha)\xi_l^{(1)'}(\alpha) - \bar{n}_{32}\xi_l^{(1)}(\alpha)\psi'_l(\bar{n}_{32}\alpha)} B_{lm} \quad (2.2.12)$$

Donde $\bar{n}_{32} = n_3/n_2$ y $()'$ representa la derivada de la función con respecto a x . Finalmente, con las expresiones para los campos caracterizadas en términos de los armónicos esféricos, se calcula la integral de superficie del tensor de energía-impulso electromagnético sobre la partícula, con lo que se obtienen expresiones para F_x , F_y y F_z . En particular, para los propósitos de este trabajo, se utilizará únicamente la fuerza generada en el eje x , que corresponde a la dirección horizontal y viene dada por:

$$F_x = -\frac{\alpha^2}{2}\epsilon_0 E_0^2 a^2 \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left[\frac{(l-m+1)(l+m+1)}{(2l+1)(2l+3)} \right]^{1/2} \quad (2.2.13)$$

$$\times l(l+2) \text{Im} \left[2n_2^2 a_{l+1,m} a_{lm}^* + n_2^2 a_{l+1,m} A_{lm}^* \right.$$

$$+ n_2^2 A_{l+1,m} a_{lm}^* + 2b_{l+1,m} b_{lm}^* + b_{l+1,m} B_{lm}^*$$

$$\left. + B_{l+1,m} b_{lm}^* + n_2 m (2a_{lm} b_{lm}^* + a_{lm} B_{lm}^* + A_{lm} b_{lm}^*) \right].$$

Con la fuerza ya caracterizada para un campo incidente arbitrario, el paso siguiente es calcular los coeficientes A_{lm} , B_{lm} , a_{lm} y b_{lm} para el campo de una onda evanescente. En particular, puesto que los coeficientes a_{lm} y b_{lm} están definidos en función de los coeficientes A_{lm} y B_{lm} , basta con calcular estos coeficientes en función del campo evanescente calculado en la sección anterior. En particular, para los propósitos de este trabajo utilizaremos solamente los coeficientes asociados a la polarización p . Con esto, los coeficientes quedan de la forma,

$$A_{lm} = \frac{\alpha_1(l, m)}{n_{21}} T_{\parallel} e^{-\beta h} [\sin(\theta_1) Q_1(l, m) - i(\sin^2(\theta_1) - n_{21}^2)^{1/2} Q_2(l, m)] \quad (2.2.14)$$

$$B_{lm} = n_2 \alpha_1(l, m) T_{\parallel} e^{-\beta h} Q_3(l, m) \quad (2.2.15)$$

Donde $n_{21} = n_2/n_1$, $\beta = \frac{n_1\omega}{c} \sin(\theta_1)$, T_{\parallel} corresponde al coeficiente de transmisión para la polarización p , que es:

$$T_{\parallel} = \frac{2n_{21} \cos(\theta_1)}{n_{21}^2 \cos(\theta_1) + i\sqrt{\sin^2(\theta_1) - n_{21}^2}} \quad (2.2.16)$$

y $\alpha_1(l, m)$ es la constante:

$$\alpha_1(l, m) = \left[\frac{2l+1}{4\pi} \frac{(l-m)!}{(l+m)!} \right]^{1/2} \frac{(b/a)^2}{l(l+1)\psi_l(k_2b)} \quad (2.2.17)$$

Finalmente, los términos Q_1 , Q_2 y Q_3 corresponden a las integrales:

$$Q_1(l, m) = 2\pi(-1)^{|m-1|} \int_0^{\pi/2} d\theta \sin^2 \theta \begin{Bmatrix} \cos \\ i \sin \end{Bmatrix} (\gamma b \cos \theta) \quad (2.2.18)$$

$$\times P_l^m(\cos \theta) [I_{|m-1|}(\beta b \sin \theta) + I_{|m+1|}(\beta b \sin \theta)]$$

$$Q_2(l, m) = 2\pi(-1)^{|m|} \int_0^{\pi/2} d\theta \sin \theta \cos \theta \begin{Bmatrix} i \sin \\ \cos \end{Bmatrix} \quad (2.2.19)$$

$$\times (\gamma b \cos \theta) P_l^m(\cos \theta) I_{|m|}(\beta b \sin \theta)$$

$$Q_3(l, m) = 2\pi i(-1)^{|m|} \frac{m}{\beta b} \int_0^{\pi/2} d\theta \sin \theta \begin{Bmatrix} \cos \\ i \sin \end{Bmatrix} (\gamma b \cos \theta) \quad (2.2.20)$$

$$\times P_l^m(\cos \theta) I_{|m|}(\beta b \sin \theta).$$

Donde $\gamma = \frac{n_1\omega}{c} \sin(\theta_1)$, y el paréntesis toma los valores $\begin{Bmatrix} \text{par} \\ \text{impar} \end{Bmatrix}$ dependiendo si $m+l$ es par o impar, $I_\nu(x)$ son las funciones de Bessel modificadas y $P_l^m(\cos \theta)$ son los polinomios de Legendre.

Con todos los términos anteriores, ya es posible calcular la fuerza ejercida sobre la partícula. Primero, se resuelven numéricamente las integrales Q_1 , Q_2 y Q_3 para cierto l y m ; una vez encontrados estos valores, se puede proceder a calcular A_{lm} y B_{lm} , con los que se pueden calcular los términos a_{lm} y b_{lm} , y finalmente, se puede realizar la sumatoria asociada a F_x sobre los valores l y m para calcular la fuerza ejercida sobre la partícula.

2.3. Manipulación experimental de Micropartículas con ondas evanescentes

Si bien ya se estableció una descripción teórica detallada de qué es una onda evanescente y de las fuerzas que ésta genera sobre una partícula, es igualmente importante tener un recuento de la aplicación experimental real de este fenómeno al empuje efectivo tanto de micropartículas esféricas como de eritrocitos, que corresponden a los dos objetos de estudio de este trabajo. Con este objetivo en mente, esta sección tiene el propósito de revisar qué tipos de experimentos se han hecho con ondas evanescentes en el contexto del empuje de micropartículas.

En el contexto de las micropartículas, el primer trabajo donde se demuestra exitosamente el desplazamiento de micropartículas por ondas evanescentes corresponde al realizado en 1992 por Katawa y Sugiura, en el cual se utilizó un prisma semiesférico de zafiro, donde se lograron empujar micropartículas de látex y partículas de vidrio [15]. El mismo Katawa y Tani logran en 1996 desplazar micropartículas a través de una guía de onda utilizando ondas evanescentes, lo que abrió la puerta al control y desplazamiento preciso de micropartículas a lo largo de una trayectoria deseada [16].

Desde estos trabajos iniciales, ha habido una explosión en la aplicación práctica de ondas evanescentes en la manipulación directa de partículas, en guías ópticas de canales integradas con microfluidica, trampas plasmónicas de superficie, arreglos de trampas ópticas generados por interferencia entre ondas evanescentes, y el desplazamiento de micropartículas dentro de medios biológicos [4, 17, 8, 18].

En el contexto de la manipulación de glóbulos rojos por medio de ondas evanescentes, si bien la literatura es más limitada, en los trabajos desarrollados por Oleg V. Angelsky et al. se desarrolla un análisis teórico extenso del movimiento y las fuerzas sobre un eritrocito inmerso en un campo evanescente, además de demostraciones experimentales donde se puede apreciar el movimiento de los glóbulos rojos en el campo evanescente [11, 19].

Por lo tanto, existe una amplia y robusta literatura que respalda la viabilidad de implementar un montaje experimental de ondas evanescentes, tanto en su aplicación a micropartículas como a glóbulos rojos.

2.4. Seguimiento de objetos

Si bien se estableció anteriormente una exhaustiva descripción teórica de la onda evanescente y de las fuerzas que esta ejerce sobre una micropartícula, además de una breve revisión histórica de los experimentos en los que se ha logrado exitosamente observar el movimiento de micropartículas debido a ondas evanescentes. Eso sí, todavía se necesita proponer una metodología que permita cuantificar el efecto real de la onda evanescente sobre micropartículas en el laboratorio.

Debido a que la metodología desarrollada en este trabajo consiste en la grabación de videos donde se registra el movimiento de las partículas que se quieren estudiar, es necesario implementar una técnica que permita extraer información cuantitativa sobre el movimiento de estas micropartículas a partir del análisis de los videos; esto se puede lograr a través de caracterizar las trayectorias descritas por las micropartículas, lo que permitiría obtener información acerca de las velocidades alcanzadas por éstas. Con este objetivo, se decidió utilizar el seguimiento de objetos, que corresponde a una familia de metodologías de visión computacional que logran identificar múltiples objetos en un video, retener sus identidades a lo largo del tiempo y finalmente reconstruir las trayectorias. Esta técnica se ha aplicado a una gran multitud de objetos, desde automóviles y transeúntes a conjuntos de animales e incluso células [20].

En particular, para este trabajo se decidió utilizar TrackMate, que corresponde a una extensión de código abierto de ImageJ, debido a su alta versatilidad, la aplicabilidad de múltiples algoritmos de seguimiento integrados, gran número de opciones para configurar el proceso de seguimiento, una interfaz que representa la información recolectada de forma visual y sencilla de entender además de entregar los datos en formatos que pueden ser utilizados con otro software para el posterior análisis. Además de ser extensamente utilizado en las ciencias biológicas precisamente para el seguimiento de células, organelos, proteínas, entre otros[21]. Por lo tanto, resulta una opción ideal para el estudio de las trayectorias de micropartículas.

2.5. Ley de Stokes

Si bien ya se tiene una forma de extraer información cuantitativa del movimiento de las micropartículas, esta se obtiene en forma de sus velocidades, mientras que el modelo teórico implementado en este trabajo entrega una expresión para la fuerza sobre las partículas; y por lo tanto, no se puede realizar una comparación directa entre los datos obtenidos y la teoría. Con el objetivo de establecer una relación entre ambas cantidades, es necesario encontrar una relación matemática entre la velocidad de una partícula en un medio con las fuerzas sobre ella. Considerando que más adelante en el trabajo se observa que las partículas alcanzan una velocidad de equilibrio, si se considera que la fuerza de roce en el medio depende de la velocidad con la que un objeto se mueve, es posible en principio relacionar la velocidad de movimiento con la fuerza ejercida a partir de un balance de fuerzas. Para esto se utilizara la ley de Stokes [22], que corresponde a una expresión para la fuerza de arrastre que experimenta un objeto esférico a medida que se desplaza en un fluido con una velocidad \mathbf{v} , y viene dada por:

$$F_a = -3\pi\mu Dv$$

Donde μ es la viscosidad del fluido, D es el diámetro de la partícula y v la rapidez de movimiento dentro del fluido. El rango de validez de esta ley corresponde a situaciones donde el número de Reynolds $\mathcal{R} = \frac{\rho v D}{\mu}$ sea menor que 1. Debido a la simplicidad, alta aplicabilidad y precisión de esta ley, se ha aplicado de forma exitosa a una multitud de áreas de estudio, como el desplazamiento de microorganismos, los tiempos de residencias de material volcánicos, los tiempos de sedimentación en agua y aire, entre otros. Por lo tanto, la ley de Stokes corresponde a una regla general para determinar velocidades terminales extremadamente útil, y ha sido utilizada por mas de 160 años como primera aproximación [22]. Por lo tanto, para los propósitos de este trabajo, se utilizara la ley de Stokes para intentar relacionar las fuerzas generadas por la onda evanescente con las velocidades registradas.

Capítulo 3

Manipulación de Micropartículas

3.1. Montaje experimental

Como se ha dicho anteriormente en este trabajo, el objetivo es lograr la manipulación de micropartículas utilizando una onda evanescente para desplazarlas, además de una adecuada cuantificación de este movimiento. Con este objetivo, la creación de un montaje experimental que sea fácil de operar y que permita la extracción de datos de los experimentos es de suma importancia. Tomando como referencia los montajes utilizados en investigaciones anteriores [8, 10, 15], se implementó el montaje experimental que se puede observar en la figura 3.1.1. Este montaje fue construido sobre una mesa óptica (1.5×2 m, Thorlabs) con el objetivo de aislar mecánicamente el montaje, el cual opera dirigiendo el haz de un láser infrarrojo (Ventus 1064, Laser Quantum) hacia el plano que contiene al prisma, donde un espejo (BB1-E03, Thorlabs) le imparte un ángulo de elevación y posteriormente es focalizado por un lente (LB1391, Thorlabs) tal que el haz alcance la máxima concentración posible en la interfaz entre el prisma y la muestra. El valor de inclinación del espejo se escoge con el objetivo de que el ángulo del haz con la normal se encuentre lo más cerca posible, pero levemente por sobre, el ángulo crítico.

La base que contiene al prisma fue construida utilizando componentes para montajes ópticos de Thorlabs disponibles en el laboratorio; en particular, se utilizó una multitud de bases móviles con el objetivo de poder regular precisamente la posición de la muestra. Además de poder controlar con exactitud la posición

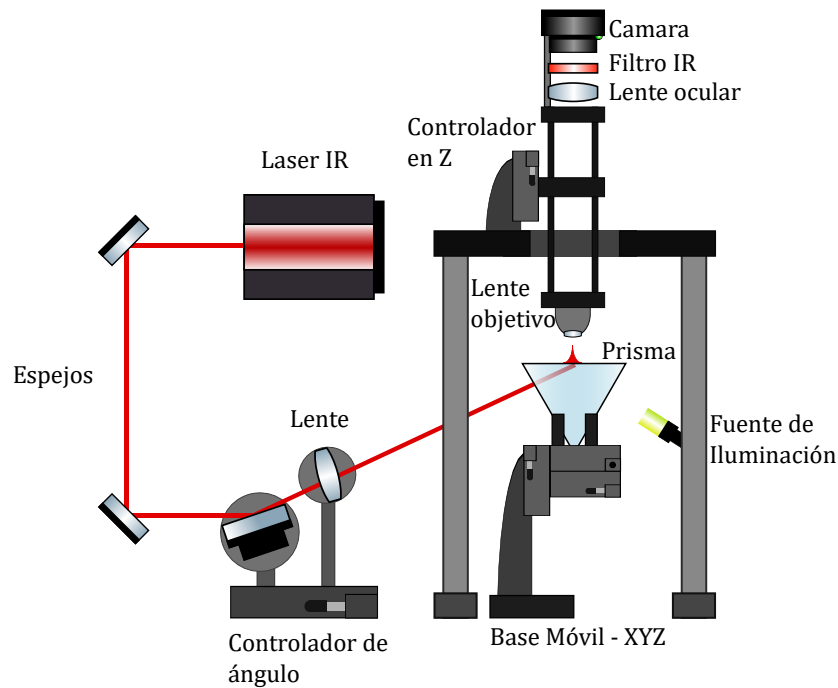


Figura 3.1.1: Esquema del montaje experimental implementado para la generación y observación de ondas evanescentes

de los prismas, se implemento un sistema de prismas intercambiables, donde se utilizan múltiples prismas pequeños que pueden ser intercambiados fácilmente simplemente retirándolos de la ranura especialmente diseñada, la cual fue creada utilizando impresión 3D.

El sistema que contiene al microscopio y a las cámaras corresponde a una base de microscopio reutilizada (Eclipse Ti-U, Nikon), puesta justo sobre la montura del prisma, y que lleva encima de ella un sistema óptico compuesto de un lente $\times 60$ (DIN 60, Edmund), un filtro infrarrojo (LMR1, Thorlabs) que permite controlar la presencia de luz del láser en las imágenes capturadas, un lente ocular del microscopio reutilizado para formar imagen en una cámara CMOS monocromática (DDC15 45-M, Thorlabs). Por ultimo, debajo de la montura del prisma se encuentra una fuente de iluminación (OSL1-EC, Thorlabs) que permite la visualización en la cámara.

Gracias a que el montaje permite controlar libremente la posición donde ocurre la onda evanescente y cambiar rápidamente de muestras hacen que el montaje sea altamente versátil y eficiente para la experimentación. En la figura 3.1.2 se pueden observar las diferentes partes del montaje real que fue implementado:

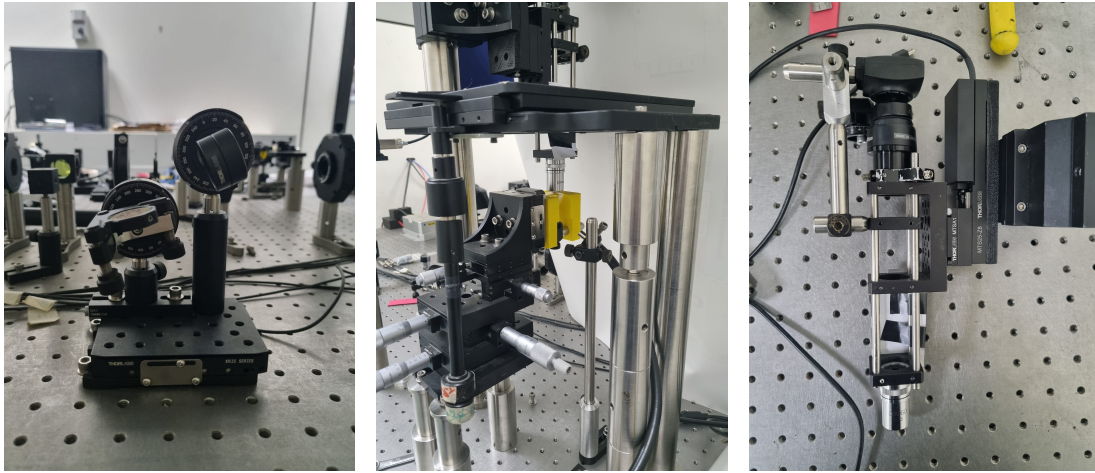


Figura 3.1.2: Imágenes del controlador de ángulo (izquierda), la plataforma para el prisma y el microscopio (centro), y sistema óptico de el microscopio (derecha) implementados en el laboratorio

En cuanto al láser utilizado, se utilizó un láser Ventus 1064 (Laser Quantum), el cual es un láser de alta gama, con una longitud de onda de operación de 1064 nm, un perfil gaussiano de intensidad, una potencia máxima de 5 W y gran estabilidad en la potencia óptica que emite. Este láser es operado desde una caja que controla la cantidad de corriente que le llega al láser. Tanto el láser como la caja que lo controla se pueden observar en la figura 3.1.3.



Figura 3.1.3: Imágenes de el láser (izquierda), y su controlador (derecha) utilizados en el montaje

Para variar la intensidad del láser, se utiliza la caja controladora, la que nos permite controlar la cantidad de corriente que le llega al láser de forma porcentual.

Debido a que en este trabajo no fue posible realizar una caracterización adecuada de el láser, para obtener sus parámetros se utilizó el trabajo doctoral de Jorge Tapia [23], en el cual se caracterizó el láser, y obtuvo que la polarización de este es polarización p . Además, se cuantificó el perfil de potencia óptica que generada por el láser en función de la corriente suministrada desde la caja se encuentra en la figura 3.1.4:

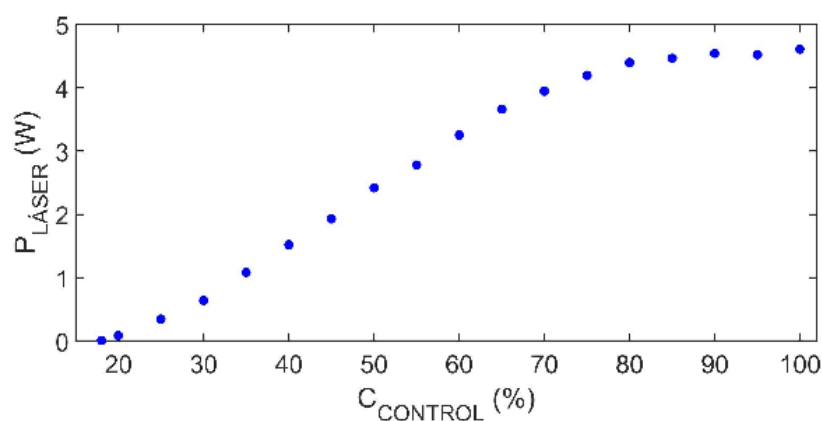


Figura 3.1.4: Relación entre la potencia óptica del láser y el porcentaje de corriente indicada en la caja de control (gráfico extraído de la tesis doctoral de Jorge Tapia [23]).

3.2. Preparación de muestras

Para los experimentos se utilizaron micropartículas de poliestireno con un diámetro de 1024 nm (Kisker-Biotech), en disolución acuosa, las cuales se encontraban originalmente en una disolución de 25 mg de poliestireno por mililitro de agua, de la cual se tomaron $2.5 \mu\text{l}$ que fueron diluidos en 2 ml de agua destilada; luego, esta nueva disolución fue diluida nuevamente al 25% de su concentración original, tal que la densidad de micropartículas fuera lo suficientemente baja para que estas no colisionen entre ellas durante la toma de mediciones.

Una vez se tiene la disolución que se pondrá sobre la onda evanescente, el paso siguiente es depositar esta disolución sobre el prisma, de forma tal que la muestra quede aislada, con el objetivo de evitar que se induzcan flujos indeseados que ensucien los datos. Para esto, se desarrolló una metodología basándose en las técnicas ya utilizadas en el laboratorio, más algunas prácticas que se obtuvieron de los laboratorios del grupo de materia activa de la Universidad de Chile, a partir de lo cual se desarrolló el siguiente protocolo para la preparación de los prismas:

1. Preparar una micro-pipeta con 15 μl de la disolución deseada.
2. Recortar un rectángulo de cinta doble faz del doble del largo deseado, y luego doblarlo sobre si mismo tal que quede material protector a ambos lados.
3. Recortar un rectángulo en el centro de la cinta doble faz preparada anteriormente.
4. Retirar la capa protectora de uno de los dos lados de la cinta doble faz preparada, y pegarla a la cara del prisma, haciendo suficiente presión con un implemento tal que quede completamente adherida.
5. Terminar de retirar la capa protectora de la cinta doble faz, tal que quede expuesto el lado con pegamento,
6. Depositar los contenidos de la micro-pipeta en el centro de la ranura doble faz, y cubrir con un cubreobjeto, lentamente para minimizar el escape de liquido de la ranura. Luego, presionar cuidadosamente los bordes del cubreobjeto para que quede bien adherido a la cinta doble faz.

Una vez realizados todos los pasos anteriores, el resultado final corresponde a una disolución de partículas de poliestireno en una agua destilada, tal como se observa en la figura 3.2.1:

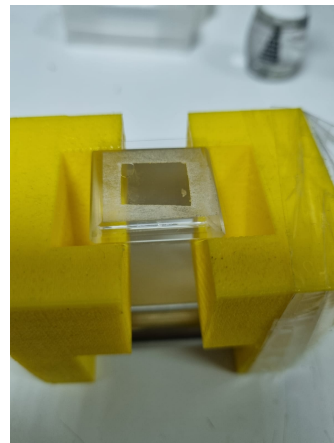
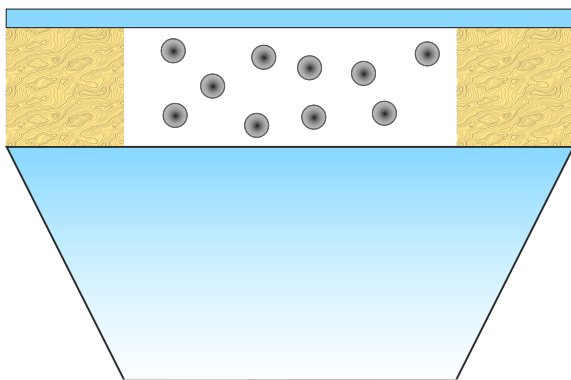


Figura 3.2.1: Esquema de la muestra preparada (izquierda) y la muestra preparada en el laboratorio (derecha).

3.3. Grabación de los videos

Una vez preparada la muestra sobre el prisma, este se inserta en la ranura del montaje, y una vez calibrado el plano imagen del microscopio, es posible observar las micropartículas directamente utilizando el software asociado a la cámara de Thorlabs, llamado Thorcam. Con esto, se obtiene una visualización de las partículas, tal como se observa en la figura 3.3.1:

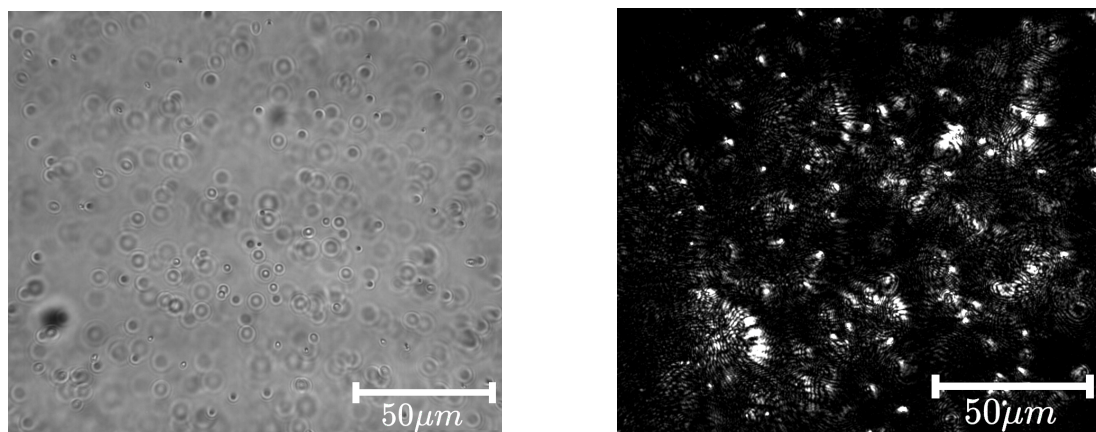


Figura 3.3.1: Imágenes de las micropartículas de poliestireno suspendidas en agua con la fuente de iluminación (izquierda) e iluminadas por la dispersión de la luz del láser (derecha)

Al trabajar con las muestras y probar con diferentes condiciones de iluminación para la grabación de los videos, se decidió que la configuración ideal para la toma de datos corresponde al caso en el que la iluminación por luz visible se encuentra completamente apagada y se utiliza solamente la luz dispersada por las partículas, ya que en esta configuración se resalta la dinámica de las partículas que están siendo afectadas por la onda evanescente y se elimina todo lo demás de la imagen, por lo que se eliminan trayectorias que no corresponderían con el movimiento inducido.

Luego, se configuraron manualmente los parámetros de la cámara tal que el reloj de píxel fuera el máximo que acepta el programa, la tasa de captura fuera de 25 fotogramas por segundo; eso sí, el tiempo de exposición era elegido caso a caso con el objetivo de lograr la mejor imagen posible de las partículas, disminuyendo sustancialmente la luz dispersada por las partículas en el video final tal que se resaltara solamente el contorno de estas. Además, en el proceso de calibración de la

cámara se obtuvo la distancia por pixel asociada al sistema óptico implementado, para lo cual se utilizó el sistema de test target (USAF 1951, Thorlabs), el cual se implementó siguiendo las instrucciones entregadas por la compañía [24], con lo que se obtuvo que la resolución espacial del microscopio correspondía a $0.163 \mu\text{m}/\text{pixel}$.

Con todos los parámetros de la cámara configurados adecuadamente, para la grabación de los videos se encendía el láser con la corriente a un 45 % de intensidad de corriente en la caja de control e inmediatamente se comenzaba la grabación de un video de las micropartículas siendo empujadas, de una duración de alrededor de 100 segundos, o 2500 fotogramas; una vez terminado uno de estos videos se grababa inmediatamente otro desplazando la porción de la muestra donde se estaba grabando. Este proceso se realizaba 4 veces por muestra preparada, con lo que finalmente se guardaban los archivos de video .avi con la estructura de nombre “ $T_{exp_Pi_Mj}.avi$ ”, donde T_{exp} corresponde al tipo de experimento que se realizó, P_i corresponde al número del prisma que se estaba midiendo, y M_j representa al número de la medición particular dentro de ese prisma. Este sistema se implementó para simplificar el posterior procesamiento de los videos.

3.4. Procesamiento de los videos

Una vez recolectada la información en videos, el paso siguiente en el análisis corresponde a la extracción de las trayectorias observadas; para esto se utilizó Fiji de ImageJ, que corresponde a un software de código abierto para analizar imágenes, y en particular, se utilizó la herramienta llamada TrackMate, que permite la extracción de trayectorias para una multitud de sistemas [21].

Para operar el programa de forma eficiente y extraer de manera consistente la información de los diferentes videos se implementó el siguiente protocolo:

1. Abrir el software, importar el video en cuestión que se busca analizar y transformarlo a escala de grises en la ventana de importación.
2. Utilizar la herramienta interna “*Slice Keeper*” que se encuentra en la sección “*Image/Stacks/Tools*”, y elegir el incremento como 2. Esto elimina la mitad de los fotogramas del video, ya que el software es incapaz de procesar los videos completos.

3. Luego, abrir la herramienta “*TrackMate*” en “*Plugins/Tracking*” y permitir que intercambie los ejes t y z .
4. Elegir el detector “*LoG detector*” y darle un radio estimado para los objetos a monitorear (micropartículas) de 10 píxeles.
5. Luego, se elige el threshold de calidad que pide el programa moviendo el slider desde el lado derecho hasta que el histograma alcanza su primera región plana distinguible, ya que ese caso corresponde al punto donde se registró la mayoría de las partículas reales, y pasado ese punto la mayoría de las partículas restantes detectadas son ruido.
6. Para estimar las trayectorias, se utiliza el estimador “*Simple LAP Tracker*”, utilizando como parámetros 25 píxeles para la unión entre posiciones de una partícula entre fotogramas, y 10 fotogramas como máxima distancia entre fotogramas en los que fue detectada la partícula.
7. Una vez que el software reconoce las trayectorias, estas se exportan utilizando la opción “*export to XML file*”, que corresponde al formato que se utilizara para procesar los videos en Matlab.

Finalmente, una vez realizado todo el proceso de análisis, obtenemos el conjunto de datos almacenado en un archivo .xml, el cual registra cada trayectoria detectada individualmente con los tiempos y posiciones asociadas a cada punto de la trayectoria, lo que se puede observar visualmente en la figura [3.4.1](#)

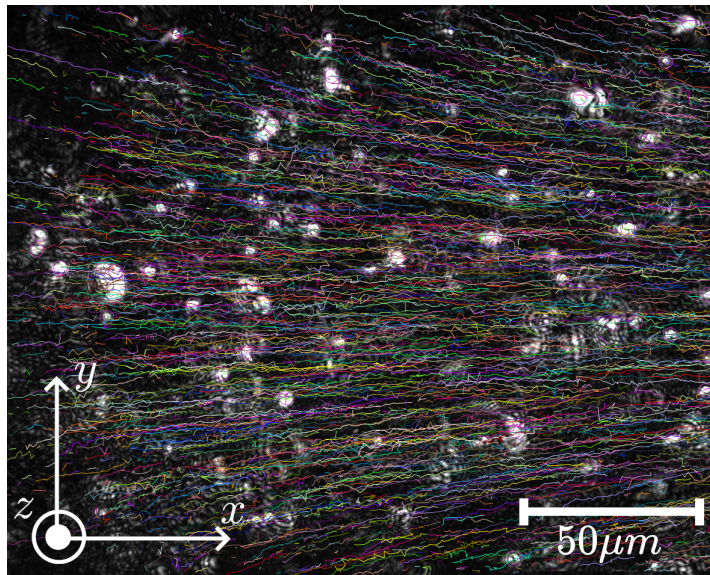


Figura 3.4.1: Representación visual de todas las trayectorias recorridas por las micropartículas superpuestas sobre el video, la imagen del fondo corresponde a la grabación del movimiento, y las líneas coloreadas representan cada una la trayectoria de una micropartícula. Generada en TrackMate.

3.5. Análisis de datos

3.5.1. Análisis de una sola medición

Una vez se completa la extracción y almacenamiento de la información de las trayectorias de las micropartículas, se importa esta información a Matlab, donde se implementó un código que extrae las trayectorias de cada partícula, filtra las trayectorias con menos de 10 posiciones, y calcula la velocidad promedio en la trayectoria de la forma $\vec{v}_P = \frac{\vec{x}_f - \vec{x}_i}{t_f - t_i}$; las que son transformadas de pixeles por fotograma a micrómetros por segundo utilizando los parámetros obtenidos anteriormente en la calibración de la cámara. Una vez obtenidas las velocidades de todas las partículas, estas se almacenan en una matriz, donde cada fila corresponde a muestra particular y cuyos elementos corresponden a las velocidades registradas para cierta partícula.

Utilizando esta metodología, es posible reconstruir un histograma de las diferentes velocidades que llevan las partículas, tal como se observa en la figura 3.5.1:

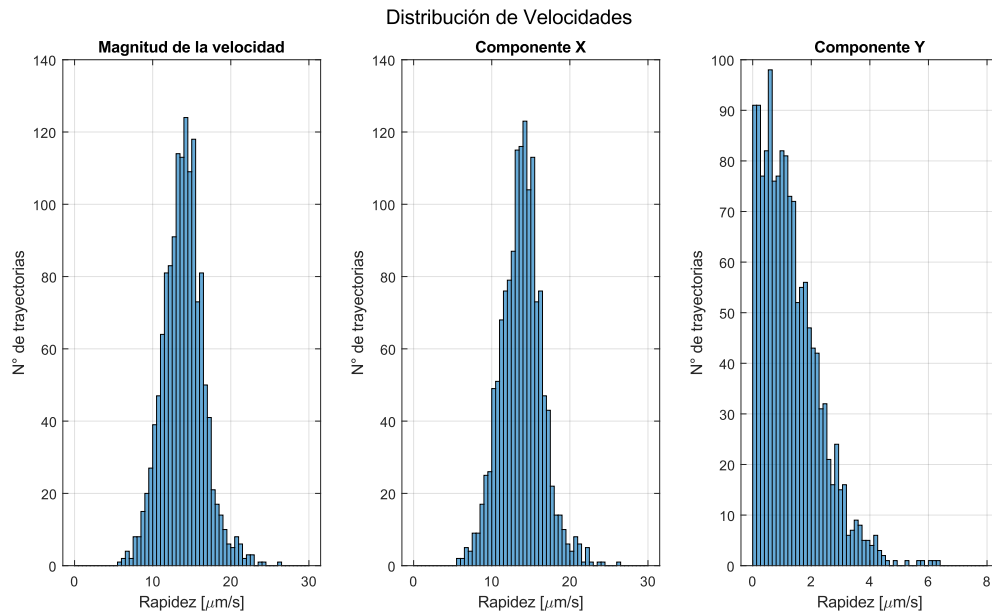


Figura 3.5.1: Histograma de las velocidades registradas por las partículas al ser empujadas por la onda evanescente.

Ahora, debido a que en cada experimento el número de trayectorias registradas es diferente, es necesario establecer una norma que permita comparar los diferentes experimentos en la misma escala. Para esto, se aproximara el histograma a una densidad de probabilidad, que defina la probabilidad de que cierta partícula se desplace con cierta rapidez; utilizando la función `ksdensity()` de Matlab, que estima la densidad de probabilidad asociada a cierta distribución, con lo que se obtienen las densidades que se observan en la figura 3.5.2:

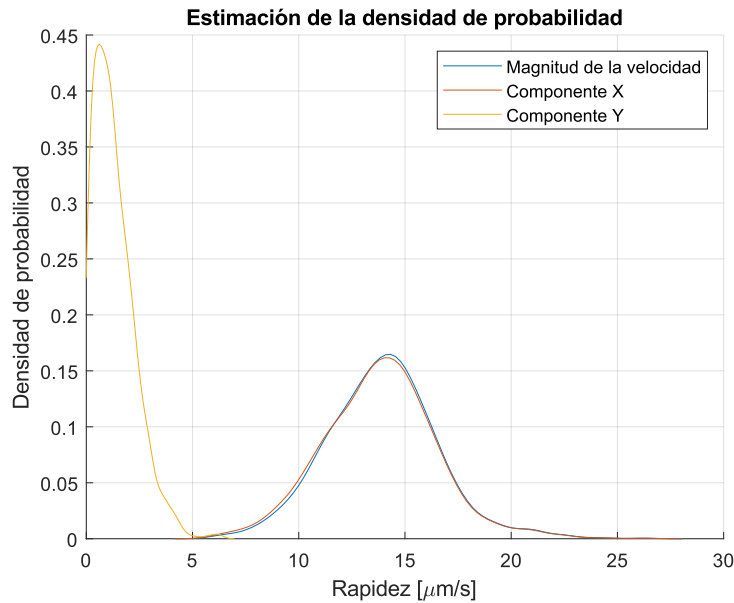


Figura 3.5.2: Densidades de probabilidad para las velocidades de las partículas estimadas a partir de los histogramas.

En la que se puede observar que tanto la magnitud de la velocidad como la componente de esta en la dirección x tienen un comportamiento bastante similar, mientras que la velocidad en el eje y se comporta de manera completamente diferente. Debido a que la dinámica de interés corresponde a la presentada por la componente x , para los análisis posteriores solamente se considerará esta componente, ya que la componente y presenta una dinámica diferente a la que se busca estudiar. Eso sí, es importante comentar que en los experimentos también se observó un comportamiento en y que atraía a las partículas al punto de mayor intensidad del haz, el cual se puede deber a fenómenos de flujo o de gradiente óptico, pero debido a que se escapa de los objetivos del trabajo, no se realizó ni una caracterización ni un análisis de esta dinámica.

3.5.2. Análisis de múltiples mediciones en el mismo prisma

Ahora que se tiene una metodología para procesar de forma consistente distintos videos con números de trayectorias diferentes, el siguiente paso es comparar las distribuciones de probabilidad de diferentes muestras dentro del mismo prisma, tal como se observa en la figura 3.5.3:

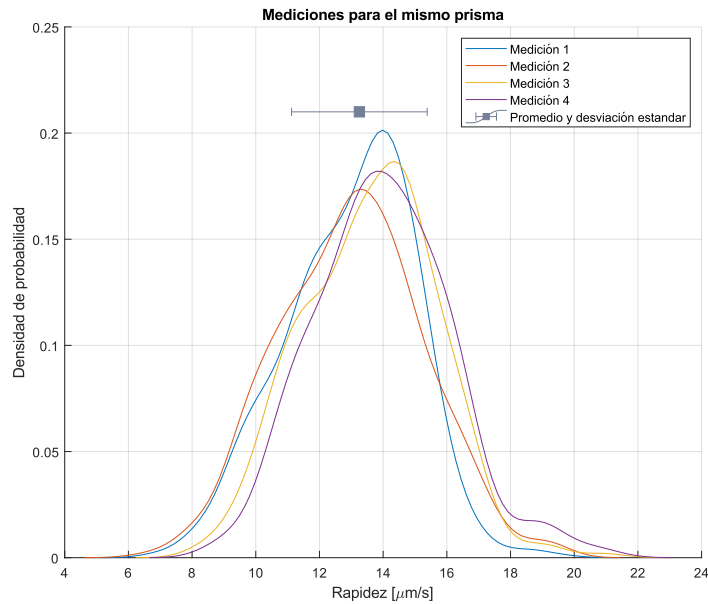


Figura 3.5.3: Densidades de probabilidad para la velocidad extraídas para diferentes muestras en el mismo prisma

Aquí se puede observar que las distribuciones para las diferentes mediciones son similares en forma, además de que tanto la mediana como la media de la velocidad para todas las distribuciones es de $13 \pm 1 \mu\text{m/s}$, y por lo tanto, la información extraída a través de la metodología implementada es consistente entre diferentes mediciones para la misma muestra, lo que apunta en la dirección de que se está extrayendo exitosamente la velocidad aproximada a la que se mueven las partículas.

3.6. Análisis de mediciones para prismas diferentes

Al repetir el análisis realizado en la sección anterior para las mediciones realizadas en dos prismas diferentes, se obtienen las distribuciones que se observan en la figura 3.6.1:

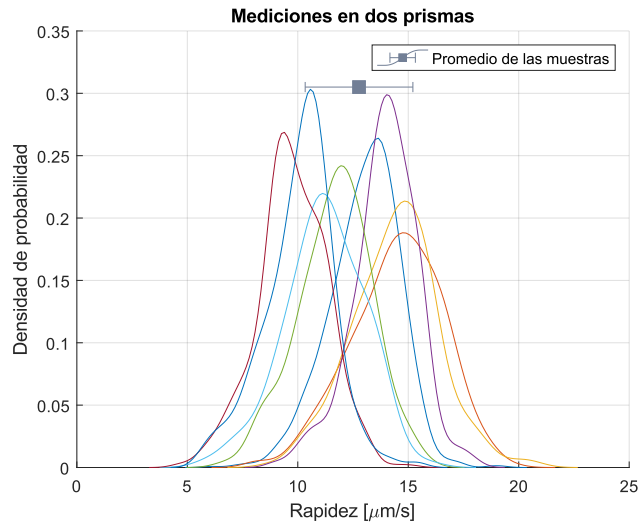


Figura 3.6.1: Densidades de probabilidad para la velocidad medidas para muestras en dos prismas distintos

En comparación con el caso para un solo prisma, estas distribuciones parecieran presentar una dispersión de las velocidades mucho más grande. Para distinguir si esta dispersión ocurre entre muestras del mismo prisma o entre los dos prismas, se separaron las distribuciones correspondientes a cada prisma por color para poder compararlas adecuadamente, tal como se observa en la figura 3.6.2:

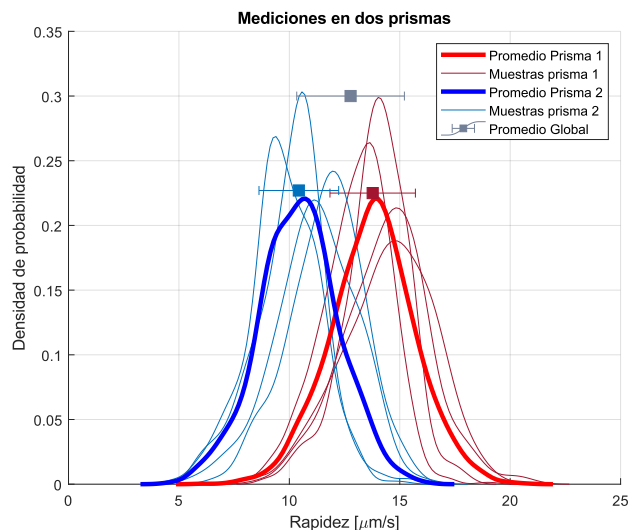


Figura 3.6.2: Densidades de probabilidad para la velocidad de las micropartículas, medidas para muestras en dos prismas distintos

De aquí se puede observar que las distribuciones obtenidas para un prisma son

significativamente diferentes que las obtenidas para el otro, con una velocidad promedio de $10.54\mu\text{m/s}$ para el prisma 1 y de $13.77\mu\text{m/s}$ para el prisma 22. Por lo tanto, se tiene que si bien las velocidades registradas dentro de un mismo prisma son similares entre ellas, las velocidades medidas entre primas parecieran variar de forma mucho más significativa las unas con las otras, lo que pareciera indicar que si bien la metodología implementada es capaz de correctamente extraer las velocidades de las partículas para una muestra. Eso sí, debido a la presencia de fuentes de error experimental sistemático, las cuales serán discutidas con mas detalle posteriormente, la metodología no es capaz de obtener de forma consistente la velocidad entre muestras.

3.7. Comparación con el modelo teórico

Ahora que se tiene una metodología que es capaz de extraer las velocidades de desplazamiento de las micropartículas de poliestireno, es de interés implementar un modelo teórico que permita estimar las velocidades que se deberían observar. Para esto, se implementara el modelo desarrollado por Almaas y Brevik [14], el cual fue discutido en detalle en la sección 2.2 del marco teórico.

Una vez implementado el modelo, para verificar su adecuado funcionamiento se utilizaron los parámetros descritos por Almaas y se recalcularon los valores para la fuerza obtenidos en el paper. De los cálculos realizados con estos valores se obtuvo una fuerza de 0.011217 pN , y puesto que la fuerza calculada en el trabajo de Almaas corresponde a 0.01 pN , se tiene que el modelo implementado es capaz de replicar los resultados obtenidos en el paper original.

Para calcular las fuerzas aplicadas sobre las partículas empujadas, primero es necesario identificar todos los parámetros físicos que el modelo requiere de nuestro sistema. En este caso, el radio de las micropartículas corresponde a 512 nm . Luego, los índices de refracción para el del agua y el vidrio vienen dados por $n_{\text{agua}} = 1.33$, y $n_{\text{vidrio}} = 1.52$ [25]; además, el índice de refracción para el poliestireno para la longitud de onda de 1064[nm] es de $n_{\text{poliestireno}} = 1.565$ [26]. Para determinar el valor de E_0^2 , se empleó la relación entre la intensidad óptica, la magnitud del campo eléctrico y el área de incidencia del haz, que viene dada por [27]:

$$I_{\text{optica}} = \frac{P_{\text{medida}}}{A_{\text{región}}} = \frac{1}{2} c \varepsilon_0 E_0^2$$

Con la relación anterior, basta con determinar la potencia de láser y área de incidencia para calcular el valor de E_0^2 . Para determinar la potencia, debido a que se trabajó al 45 % de la corriente máxima del medidor, se utilizó la caracterización realizada por Jorge Tapia [23], obteniéndose una potencia de aproximadamente 1.8[W]. Por otro lado, para determinar el área de incidencia del haz se utilizó un lente con un aumento $\times 20$, el que permitía observar la totalidad del área del haz; luego, utilizando el software the Thorlabs se midió el área de la región en pixeles, tal como se muestra en la figura 3.7.1, y tras calibrar la relación pixel-distancia para este lente, se obtuvo un área para el haz de $6.66 \cdot 10^{-7} [m^2]$.

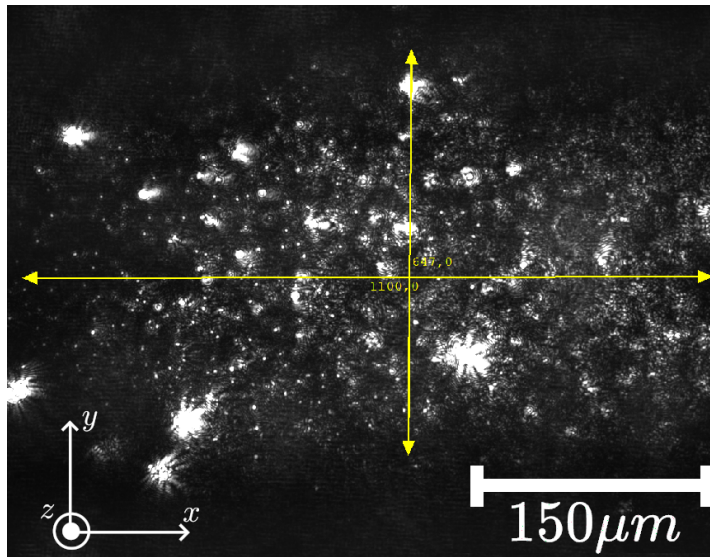


Figura 3.7.1: Medición del área del haz del láser utilizando la regla de Thorcam

El único parámetro restante por caracterizar corresponde a la distancia entre la partícula y el plano; pero debido a que el montaje experimental implementado no tiene forma de controlar o medir la distancia de las partículas a la superficie del prisma, no es posible caracterizar este parámetro. Debido a esto, los cálculos del modelo se realizaron para múltiples distancias entre el prisma y las partículas, con el objetivo de comprobar si los valores obtenidos en el modelo son similares a los medidos en el experimento.

Una vez calculada la fuerza en función de la distancia, es necesario lograr establecer

cómo compararla con los datos que se extrajeron de los videos, que corresponden a las velocidades de las partículas. Para esto, utilizaremos la ley de Stokes, que permite relacionar la fuerza que realiza un medio sobre partículas esféricas en términos de su velocidad. Esta ley se puede utilizar solamente en el caso de que el número de Reynolds del sistema sea bajo [22]; afortunadamente, para nuestro sistema este número es de aproximadamente $R \sim 10^{-5}$, por lo que la aproximación es adecuada. Con esto, debido a que las partículas se mueven a rapidez constante, asumiendo que la fuerza de arrastre que sienten las partículas es igual a la fuerza que ejerce la onda evanescente sobre estas, es posible relacionar la velocidad medida con la fuerza calculada de la siguiente forma:

$$F_{\text{evanescente}} = F_{\text{arrastre}} = 3\pi\mu D v_{\text{partícula}} \quad (3.7.1)$$

y por lo tanto, la velocidad teórica de las partículas viene dada por:

$$v_{\text{partícula}} = \frac{F_{\text{evanescente}}}{3\pi\mu D} \quad (3.7.2)$$

Luego, las velocidades teóricas se obtuvieron realizando el cálculo de la fuerza en función de la distancia, y luego utilizando la ecuación 3.7.2, se obtuvieron las velocidades esperadas para las partículas, que se pueden observar en los gráficos de la figura 3.7.2:

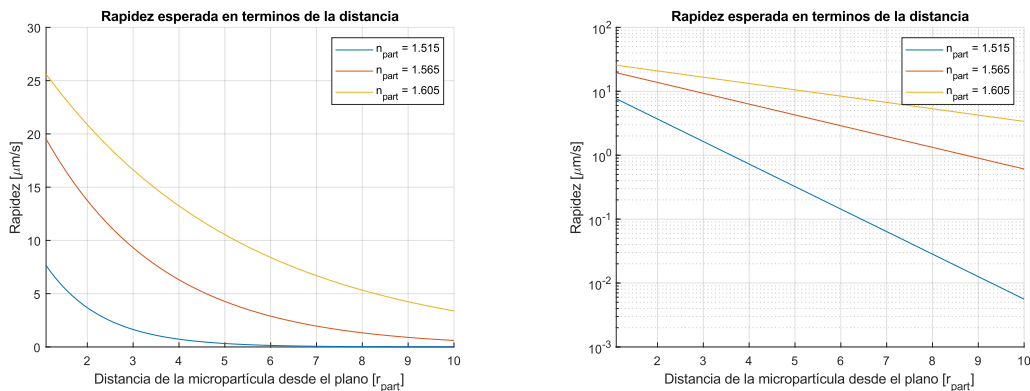


Figura 3.7.2: Gráficos de las velocidades calculadas numéricamente en Matlab para diferentes índices de refracción de las micropartículas, en escala lineal (izquierda) y logarítmica (derecha).

En los gráficos de la figura 3.7.2, se observa que las velocidades calculadas se encuentran en el mismo orden de magnitud de las obtenidas experimentalmente,

alrededor de los $10\mu\text{m/s}$, lo que si bien no valida el modelo calculado, puede que resulte ser aplicable a un mayor número de situaciones experimentales de interés.

3.8. Discusión

Considerando todo lo discutido en el capítulo, se tiene que se logró exitosamente la implementación experimental de ondas evanescentes para el desplazamiento de micropartículas, además la adecuada cuantificación de las velocidades inducidas. No obstante, el montaje presenta una variabilidad considerable entre los resultados de las mediciones para diferentes prismas, lo que parece indicar que el cambio de prismas agrega una cantidad significativa de error. Esto probablemente se debe a que entre cambios de prismas es necesario reubicar e haz del láser, lo que puede modificar tanto que tan enfocado esta el láser como la posición exacta en la que se está grabando, lo que probablemente contribuye de forma significativa al error sistemático. Para solucionar esta problemática, existen dos soluciones sencillas de implementar:

1. La primera corresponde a simplemente fijar el prisma en una sola ubicación, tal que la región del láser que estamos grabando corresponda siempre a la misma. Si bien esta se presenta como la solución más sencilla a la problemática, podría ser inconveniente perder la capacidad de controlar la región de la muestra que se observa, que corresponde a una ventaja poco común entre montajes de ondas evanescentes, pero puede ser adecuada como solución si no se considera necesario controlar la posición en la muestra.
2. La segunda solución corresponde a cambiar el componente móvil del sistema del prisma a un porta muestras, tal que este se encuentre levemente sobre el prisma y se pueda mover libremente, y entre ellos haya una capa de aceite de inmersión, de forma que actúe como un medio óptico continuo y permite desplazar libremente la muestra por sobre la superficie del prisma, manteniendo constante la zona de la onda evanescente. Si bien esta solución pareciera resolver completamente el problema de error sistemático sin desventajas, es posible que al agregar aceite de inmersión entre la muestra y el prisma pueda generar otros problemas, tales como la aparición de nuevas formas de ruido imprevistas, que el aceite de inmersión utilizado no sea completamente transparente en la frecuencia de operación del láser, o que

el índice de refracción del aceite de inmersión sea muy diferente para la longitud del láser.

Eso sí, a pesar del error sistemático presente en el cambio de prismas, la metodología para la cuantificación del movimiento de las micropartículas logró de forma exitosa identificar las velocidades de las partículas desplazadas, esto se puede observar en el hecho de que para que dentro del mismo prisma las mediciones sean bastante consistentes entre sí.

En relación con el modelo teórico implementado, este resulta ser consistente con las observaciones experimentales. No obstante, para caracterizar con mayor precisión la magnitud de las fuerzas presentes, uno de los principales desafíos futuros para el montaje es desarrollar una metodología de control o cuantificación experimental de la distancia de las micropartículas a la interfaz, de manera que esta distancia pueda ser tomada en cuenta al calcular el valor de la fuerza esperada. Este problema es de interés científico general, ya que ha sido un factor limitante en otros trabajos [28], y por lo tanto, constituye un desarrollo prometedor para aumentar la relevancia del montaje ya implementado.

Capítulo 4

Manipulación de Glóbulos Rojos

Una vez implementada una metodología que permite determinar con relativa precisión las velocidades de micropartículas desplazadas por ondas evanescentes, el siguiente objetivo consiste en aplicar esta técnica al estudio de un sistema de interés específico. En este contexto, en el trabajo de Jorge Tapia, Nicolás Vera y Juan Pablo Staforelli [29], se realizaron mediciones de las propiedades físicas de la membrana de eritrocitos a diferentes concentraciones de glucosa, donde se logró determinar que la concentración de glucosa afecta de manera sutil pero significativamente las propiedades físicas de las membranas de los glóbulos rojos. En el contexto de esta tesis, debido a que la onda evanescente aplica la fuerza a distancias muy cercanas a la interfaz, es posible que las propiedades de membrana de los glóbulos afecten la fuerza que estos experimentan debido a la onda evanescente, o que las propiedades de membrana influyan en la dinámica de movimiento de los glóbulos en un fluido, y por lo tanto, se intentará identificar si efectivamente existe una diferencia de velocidad apreciable entre glóbulos para diferentes concentraciones de glucosa.

4.1. Modificaciones con respecto al protocolo anterior

Si bien el montaje utilizado para estos experimentos corresponde al mismo que se utilizó para las micropartículas de poliestireno, es necesario implementar ciertas diferencias para que el experimento se ajuste mejor al procesamiento de glóbulos

rojos.

La principal modificación corresponde a la incorporación de un método de medición que considera dos regiones dentro del mismo prisma; esto se implementa como una medida que busca establecer una forma de controlar el error sistemático que se incorpora al sistema cuando se realiza un cambio de prisma entre mediciones.

Donde el método de preparación es idéntico al planeado en el capítulo 3, con dos modificaciones; primero, el procedimiento se realiza dos veces, una para cada región, con una muestra de micropartículas y otra de glóbulos; segundo, se agrega una capa de esmalte entre regiones para evitar la mezcla de ambas muestras. Por lo tanto, para las muestras de glóbulos, se agregó una segunda muestra con micropartículas de control, tal como se observa en la figura 4.1.1.

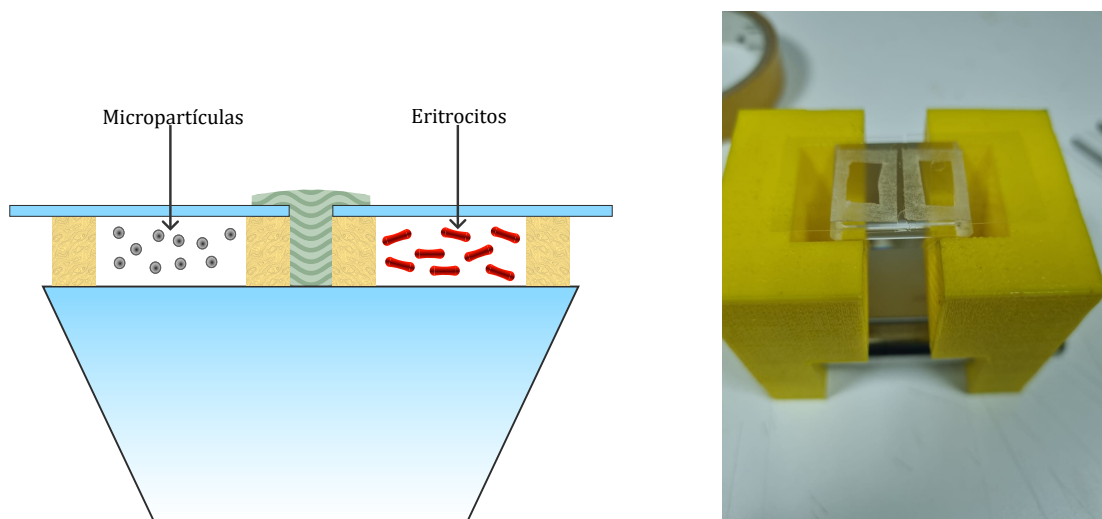


Figura 4.1.1: Esquema de la muestra de glóbulos preparada (izquierda) y la muestra preparada en el laboratorio (derecha).

La metodología de captura de videos mantiene el mismo protocolo descrito en el capítulo anterior, con la adición de que se toman mediciones para ambas regiones, primero en la región de glóbulos y luego en la de micropartículas. Además el tiempo de exposición se ajusta manualmente para cada región, tal que la información contenga el menor ruido posible. Estos videos son grabados y almacenados con la siguiente estructura de nombre “ $T_{exp_Pi_Ri_Mj.avi}$ ”, que es idéntica a la anterior, con la adición del campo Ri , que indica en cual de las 2 regiones del prisma se encuentra la medición. En la figura 4.1.2, se puede observar cómo se ven los glóbulos rojos con iluminación convencional y con iluminación láser.

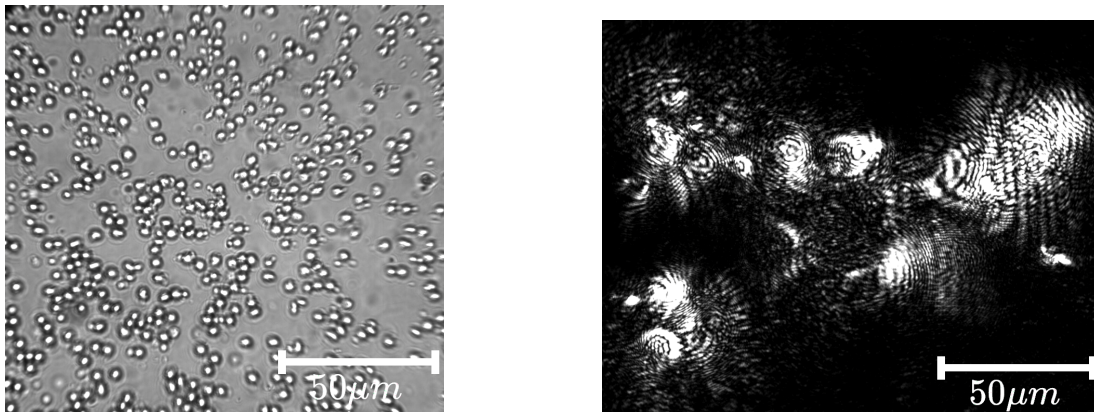


Figura 4.1.2: Imagen de los glóbulos bajo el microscopio con iluminación directa (izquierda) y por dispersión del láser infrarrojo (derecha).

Una vez establecido el protocolo para la preparación de muestras y la captura de información, es necesario corroborar si esta metodología puede incorporar dos regiones de medición en las que midan las mismas velocidades. Con este objetivo, se realizó una prueba de control midiendo velocidades de micropartículas en 2 regiones para un mismo prisma, las que fueron comparadas posteriormente tal como se muestra en la figura 4.1.3.

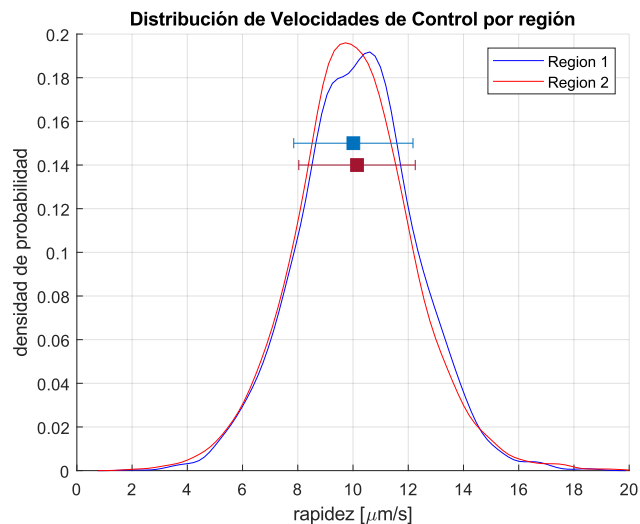


Figura 4.1.3: Comparación de las distribuciones de probabilidad para las velocidades de las partículas para dos regiones dentro de un mismo prisma.

Se puede observar en la figura que las distribuciones de velocidad de micropartículas entre las dos regiones del prisma son casi idénticas, y por lo tanto, cualquier error sistemático que introduzca la medición en ese prisma particular va a estar presente

en ambas muestras, lo que permite utilizar la segunda región como una medición de control, tal que si las mediciones entre múltiples prismas de las mediciones de control son similares en forma, quiere decir que el efecto del error sistemático no es tan agresivo entre las muestras de interés que buscamos comparar. Por lo tanto, el análisis de los datos de las regiones de control funciona como un indicador del nivel de ruido sistemático.

Finalmente, el protocolo de procesamiento en ImageJ los eritrocitos presenta pocas diferencias con el implementado para las micropartículas, Estas diferencias corresponden a que se escogió un radio efectivo de 30 píxeles en vez de 10, ya que los glóbulos son de mayor tamaño que las partículas; además, el factor de calidad se escogió de forma manual en cada caso, ya que no se logró identificar una regla general tal que la identificación de glóbulos no incluyera además una gran cantidad de trayectorias mal identificadas, seguimientos falsos de la luz dispersada y ruido. Aplicando esto se obtuvieron trayectorias de la forma como se observan en la figura 4.1.4:

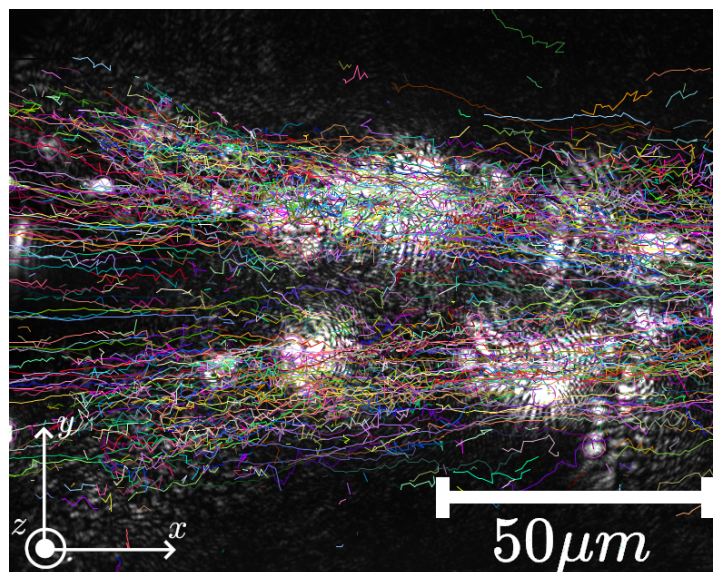


Figura 4.1.4: Representación visual de las trayectorias descritas por los glóbulos, superpuestas sobre el video procesado; generada en TrackMate.

Cabe destacar que en comparación con el caso de las micropartículas, el número de trayectorias identificadas es sustancialmente menor, debido al menor número de objetos, pero también debido a que el programa presentó mayores dificultades en rastrear de forma exitosa todos los glóbulos. Además, estas trayectorias son

sustancialmente más ruidosas que en el caso de las micropartículas, debido a que el movimiento de los glóbulos era más errático y el patrón de la luz dispersada era menos regular, con una mayor variedad de formas cambiantes en el tiempo que para las partículas.

4.2. Análisis de las velocidades de los glóbulos

Para caracterizar sistemáticamente el efecto de la concentración de la glucosa (5 mM vs 50 mM) sobre las velocidades de los glóbulos rojos, se realizaron mediciones en ocho prismas diferentes, con el objetivo de obtener una cantidad significativa de datos, cuatro de estos prismas se midieron a 5 mM, y cuatro se midieron a 50 mM, con cuatro mediciones de glóbulo y cuatro mediciones de control por prisma, llevando a un total de 64 mediciones individuales a procesar.

Luego, todas las velocidades extraídas para cierto caso, esto es glóbulos a 5 mM, glóbulos a 50 mM, control para 5 mM y control para 50 mM, fueron agrupados en una sola distribución, con el objetivo de identificar patrones globales que permitieran diferenciar claramente las diferentes distribuciones de velocidades. Estos resultados se pueden observar en la figura 4.2.1:

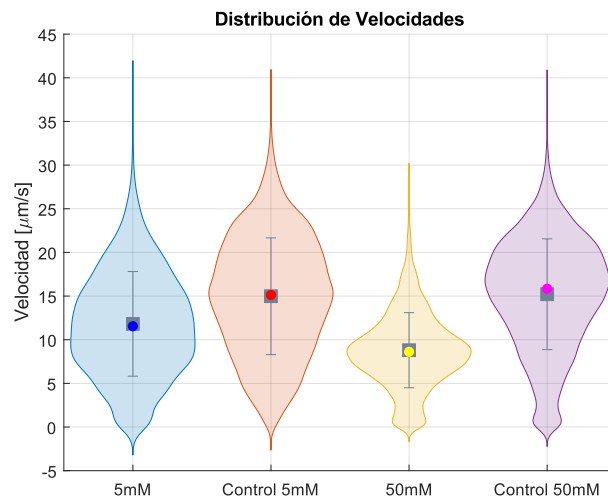


Figura 4.2.1: Diagrama de violín para las mediciones de glóbulos rojos a diferentes concentraciones de glucosa y sus respectivos controles, las barras grises corresponden al promedio y desviación estándar respectivos, mientras que los puntos de colores indican las medianas del set de datos.

Del análisis del gráfico, se observa que si bien en ambos casos las micropartículas

de control tienen valores de velocidad promedio de alrededor de $15\mu\text{m/s}$ y distribuciones similares en forma, se tiene que para las mediciones en glóbulos, el promedio de las mediciones de velocidad a 5 mM es de $11.8\mu\text{m/s}$, el cual es sustancialmente mayor al promedio para las velocidades a 50 mM de de $8.8\mu\text{m/s}$. Además, tenemos que la diferencia en la forma entre las distribuciones de los glóbulos es significativa en comparación a las diferencias de forma entre las distribuciones de los controles, lo que podría indicar de que efectivamente la diferencia en la concentración glucosa tiene un efecto en la velocidad de desplazamiento de los glóbulos en la onda evanescente.

Para realizar un análisis estadístico más detallado, se calculó el valor promedio de la velocidad para cada medición y se agruparon estos valores por tipo, a partir de lo cual se obtuvo la figura 4.2.2.

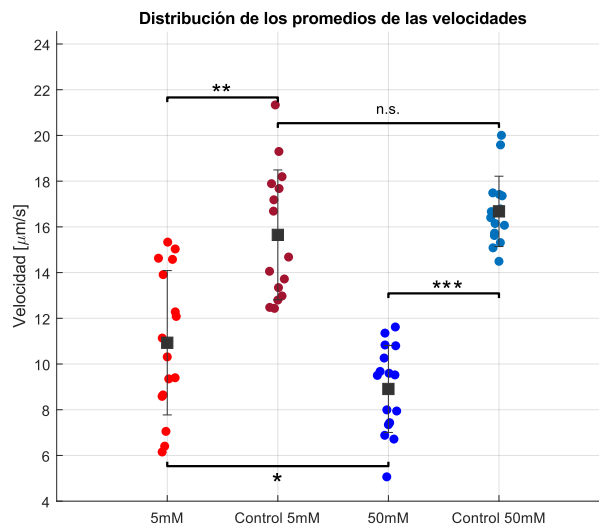


Figura 4.2.2: Velocidades promedio para las diferentes mediciones realizadas en glóbulos rojos a diferentes concentraciones de glucosa. Cada grupo contiene las velocidades promedio de las 16 mediciones realizadas para cada caso estudiado, con su promedio y desviación estándar representado con la línea gris asociada a cada conjunto. También se puede observar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre todos los conjuntos de datos a excepción de ambas muestras de control.

Luego, si se calculan los valores p para entre las distribuciones de control, se obtiene que $p_{\text{cnt5-cnt50}} = 0.3$, lo que indica que la diferencia entre ambos no es estadísticamente significativa. Si luego calculamos los valores p entre las mediciones

de glóbulos y sus controles se obtiene que $p_{\text{glb5-cnt5}} = 0.003$ y $p_{\text{glb50-cnt50}} = 6.7e - 11$, lo que nos indica que las diferencias entre las velocidades de los glóbulos y sus respectivos controles son estadísticamente significativas, que es lo esperable. Finalmente, si se toma el valor p entre las velocidades para los glóbulos a diferentes concentraciones de glucosa se obtiene que $p_{\text{glb5-glb50}} = 0.019$, lo que indica que las diferencias entre las velocidades son estadísticamente significativas.

4.3. Discusión

Del análisis realizado en glóbulos rojos, se puede concluir que la técnica desarrollada para la cuantificación del movimiento de micropartículas se logró aplicar de forma exitosa al la cuantificación del movimiento de los glóbulos rojos. Sin embargo, es importante destacar que si bien se lograron identificar las trayectorias, el método utilizado para caracterizarlas presentó un rendimiento inferior que para el caso de las micropartículas. Específicamente, se identificaron menos trayectorias y se registró una mayor cantidad de errores en el reconocimiento de los glóbulos rojos, y por lo tanto, si bien la metodología es lo suficientemente precisa para identificar diferencias entre los distintos casos, resulta de interés buscar formas de mejorar la detección de glóbulos rojos, además de explorar otras metodologías para la caracterización del movimiento de glóbulos en el futuro.

Respecto a las diferencias observadas entre los glóbulos en distintas concentraciones de glucosa, fue posible detectar una variación estadísticamente significativa en sus velocidades promedio, eso sí, debido a la presencia de errores sistemáticos es posible que este efecto se vea exagerado o minimizado, y por lo tanto, es de interés poder implementar a futuro modificaciones tanto en el montaje experimental como en el procesamiento de video, con el objetivo de minimizar errores estadísticos.

Dado que se estableció la presencia de estas variaciones en la rapidez de los glóbulos para distintas concentraciones de glucosa, si se considera que esta diferencia se debe a la variación en las propiedades de membrana de los glóbulos en función de la concentración de glucosa descritas por el trabajo de Tapia et al. [29], es necesario establecer a partir de que posible mecanismo esta variación en la membrana podría afectar la velocidad de movimiento de los glóbulos. En el contexto de este trabajo, se plantean los siguientes posibles mecanismos:

- Que la onda evanescente actué de forma diferente sobre la membrana celular

debido a que sus propiedades mecánicas o área de interacción efectiva se vean alteradas.

- Que sea la interacción entre el glóbulo y el medio acuoso en el que se desplaza la que se vea afectada, y por lo tanto, la fuerza de arrastre que este medio genera sobre los glóbulos sea diferente.

Que corresponde a si el efecto en la velocidad se debe mayoritariamente a cómo el glóbulo interactúa con la onda evanescente o el medio en el que se encuentra presente, y por lo tanto, es de interés diseñar un experimento que permita dilucidar si es alguno de estos dos efectos los que son responsables de la variación en la velocidad de los glóbulos.

Si bien en este trabajo solamente se consideró la concentración de glucosa como variable entre muestra, hay otros factores importantes a considerar que pueden afectar las propiedades de membrana que no fueron considerados en este trabajo. Un caso particularmente relevante corresponde a la temperatura, que en el trabajo de Fregin et al. [30] se ha demostrado que afecta significativamente a las propiedades de membrana de los glóbulos, y por lo tanto implementar un mecanismo de control de temperatura en el experimento podría resultar en un efecto aun mayor en las velocidades de los glóbulos. Con respecto a este punto, es importante señalar que si bien no se logro controlar la temperatura en el experimento, debido a que las mediciones se realizaron en un ambiente controlado y durante el mismo periodo de tiempo, de forma intercalada entre las diferentes concentraciones de glucosa, es razonable asumir que las diferencias de temperatura no jugaron un rol significativo en los datos obtenidos.

Otro fenómeno observado corresponde a que durante el análisis manual de videos, se detecto que los glóbulos rojos presentaban movimiento a distancias desde la interfaz significativamente mayores que las predichas para un sistema dominado exclusivamente por una onda evanescente. En concreto, se cuantificó manualmente la velocidad de glóbulos cercanos a la interfaz y de aquellos ubicados en regiones lejanas (completamente desenfocados), correspondientes a distancias de al menos $3\mu\text{m}$ sobre la interfaz. Mientras que los glóbulos cercanos exhibieron una velocidad promedio de $10.58\mu\text{m/s}$, los lejanos mostraron una velocidad promedio de $5.81\mu\text{m/s}$, lo que indica la presencia de movimiento significativo en zonas donde teóricamente la influencia de la onda evanescente debería ser despreciable, dado

que se encuentran muy por sobre la distancia de penetración del láser utilizado ($d_p \sim 250\text{nm}$). Este resultado contradice el modelo convencional que restringe la acción de la onda evanescente a las proximidades de la interfaz. Para explicar este fenómeno, se proponen cuatro hipótesis:

- Que la fuerza generada por la onda evanescente pueda extenderse de forma significativa a distancias mayores que las esperadas teóricamente.
- Que los glóbulos observados en la parte superior simplemente correspondan a glóbulos que originalmente estaban más cerca de la interfaz y que por la dinámica del medio se hayan desplazado a una distancia superior y que conservaran parcialmente la velocidad adquirida anteriormente por inercia.
- La onda evanescente podría estar induciendo un flujo en el medio, el cual se debería propagar difusivamente desde la interfaz y por lo tanto tener un efecto de mayor alcance que el alcanzado simplemente por fuerzas ópticas.
- Debido a la alta concentración de eritrocitos utilizada, el movimiento de estos glóbulos induce un flujo en el medio, que al igual que en el caso anterior, induce un flujo que decae a lo largo del eje z que podría ocasionar el desplazamiento de glóbulos alejados.

Aunque la literatura no reporta mecanismos de flujo inducido por ondas evanescentes, existen antecedentes de fenómenos análogos en otros sistemas. Por ejemplo, Wang et al. [31] demostraron en 2017 que la interacción láser-nanopartículas puede generar flujos en medios fluidos. En nuestro experimento, un mecanismo similar podría estar operando en la zona de incidencia de la onda evanescente, dando lugar a un flujo residual capaz de explicar las velocidades observadas a grandes distancias. En el caso de que el flujo sea ocasionado por los glóbulos, sabemos que este flujo debe tener la misma velocidad que la de los glóbulos desplazados, lo que se podría utilizar para estimar la velocidad que los glóbulos a más de $3 \mu\text{m}$ sobre la interfaz.

En conclusión, se logró de forma exitosa la utilización de la metodología desarrollada en el capítulo 3 al estudio de la caracterización del desplazamiento de glóbulos rojos debido a la onda evanescente; además, fue posible utilizar esta metodología para estudiar como la concentración de glucosa afecta a la velocidad de los glóbulos, y se logró identificar de forma estadísticamente significativa que el aumento en la concentración de glucosa disminuye la velocidad de los glóbulos.

Capítulo 5

Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se implementó exitosamente un montaje experimental para la manipulación directa de micropartículas mediante ondas evanescentes. Asimismo, se desarrolló una metodología integral que abarca la preparación de muestras, la grabación de experimentos para optimizar la extracción de datos, el análisis de videos para reconstruir las trayectorias de las micropartículas, y el procesamiento de dichos datos para determinar velocidades y cuantificar exitosamente la dinámica. Adicionalmente, se implementó un modelo teórico para calcular las fuerzas que actúan sobre las partículas, el cual se vinculó con las observaciones experimentales mediante la ley de Stokes. Los resultados obtenidos coincidieron aproximadamente con los valores teóricos, aunque persisten discrepancias atribuibles a la falta de caracterización del parámetro de distancia entre la partícula y la interfaz.

Esta metodología desarrollada se extendió al estudio de glóbulos rojos, permitiendo cuantificar las velocidades debido al efecto de la onda evanescente. Además, se aplicó para comparar el comportamiento de glóbulos rojos en distintas concentraciones de glucosa. Si bien hay presencia de errores sistemáticos que pueden distorsionar la magnitud del efecto medido, se logró identificar diferencias estadísticamente significativas en las distribuciones de velocidades para ambos casos, y por lo tanto, es posible afirmar que la concentración de glucosa afecta la velocidad de desplazamiento de los glóbulos rojos.

En síntesis, se cumplieron todos los objetivos generales y específicos propuestos al inicio del trabajo. Respecto a la hipótesis, se confirmó que es posible utilizar las ondas evanescentes para manipular micropartículas, y posteriormente cuantificar el

movimiento de estas micropartículas. Además, se logró establecer que efectivamente la concentración de glucosa disminuye la velocidad de los glóbulos empujados con la onda evanescente, aunque no se logró establecer exactamente qué mecanismo es el responsable de esta diferencia,

Para concluir, en cuanto a futuras líneas de investigación, se identifican tres áreas prioritarias: en primer lugar, resulta fundamental optimizar el montaje experimental para reducir el error sistemático asociado al cambio entre muestras. En segundo término, sería valioso implementar una metodología que permita caracterizar con mayor precisión la distancia de las partículas a la interfaz, lo cual facilitaría la cuantificación de las fuerzas actuantes sobre las micropartículas. Finalmente, se sugiere extender el estudio mediante experimentos con distintos tipos de micropartículas, con el objetivo de evaluar los límites de validez del modelo teórico propuesto.

En el caso específico de los glóbulos rojos, algunos posibles líneas de desarrollo futuro corresponden a implementar nuevas técnicas de cuantificación del movimiento que minimicen el ruido experimental y los errores asociados, identificar si es la interacción entre el glóbulo y el medio o el glóbulo y la onda evanescente el responsable de las diferencias en velocidades, explorar el efecto de parámetros como la temperatura sobre las propiedades de membrana y observar su efecto en las velocidades medidas, y verificar la posible existencia de flujos inducidos, lo cual permitiría elucidar el mecanismo responsable del movimiento observado en glóbulos distantes de la interfaz.

Bibliografía

- [1] Barry R Masters. History of the optical microscope in cell biology and medicine. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2008. doi: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003082>.
- [2] Wenhao Xu. Microinjection and micromanipulation: A historical perspective. *Methods in Molecular Biology*, 2018. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0_1.
- [3] G. Bao and S. Suresh. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*, 2003. doi: <https://doi.org/10.1038/nmat1001>.
- [4] Petra Paiè, Tommaso Zandrini, Rebeca Martínez Vázquez, Roberto Osellame, and Francesca Bragheri. Particle manipulation by optical forces in microfluidic devices. *Micromachines*, 2018. doi: <https://doi.org/10.3390/mi9050200>.
- [5] A. Ashkin. History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2000. doi: <https://doi.org/10.1109/2944.902132>.
- [6] Kishan Dholakia and Peter Reece. Optical micromanipulation takes hold. *Nano Today*, 2006. doi: [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(06\)70019-6](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70019-6).
- [7] Milan Milosevic. On the nature of the evanescent wave. *Applied Spectroscopy*, 2013. doi: <https://doi.org/10.1366/12-06707>.
- [8] Oleg V. Angelsky, Claudia Yu Zenkova, Steen G. Hanson, and Jun Zheng. Extraordinary manifestation of evanescent wave in biomedical application. *Frontiers in Physics*, 2020. doi: <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00159>.
- [9] Derek Toomre and Dietmar J. Manstein. Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends in Cell Biology*, 2001. doi: [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02027-X](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02027-X).
- [10] Chris Rowe Taitt, George P. Anderson, and Frances S. Ligler. Evanescent wave fluorescence biosensors: Advances of the last decade. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.040>.
- [11] Oleg V. Angelsky, Peter P. Maksymyak, Claudia Y. Zenkova, Andrew P. Maksymyak, Steen G. Hanson, and Dimitrov D. Ivanskyi. Peculiarities of

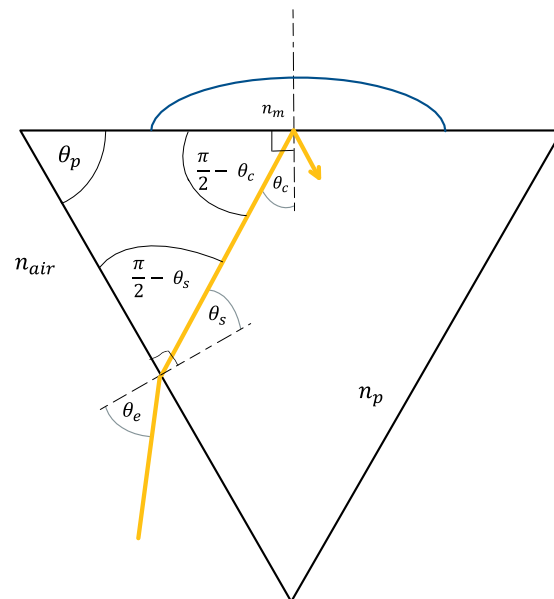
- control of erythrocytes moving in an evanescent field. *Journal of Biomedical Optics*, 2019. doi: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.24.5.055002>.
- [12] Milan Milosevic. *Internal Reflection and ATR Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. ISBN 9781118309742. doi: <https://doi.org/10.1002/9781118309742.fmatter>.
- [13] Manuel Nieto-Vesperinas and J. Ricardo Arias-Gonzalez. Theory of forces induced by evanescent fields. 2011. doi: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1102.1613>.
- [14] E. Almaas and I. Brevik. Radiation forces on a micrometer-sized sphere in an evanescent field. *J. Opt. Soc. Am. B*, 1995. doi: 10.1364/JOSAB.12.002429.
- [15] Satoshi Kawata and Tadao Sugiura. Movement of micrometer-sized particles in the evanescent field of a laser beam. *Opt. Lett.*, 1992. doi: 10.1364/OL.17.000772.
- [16] S. Kawata and T. Tani. Optically driven mie particles in an evanescent field along a channeled waveguide. *Opt. Lett.*, 1996. doi: 10.1364/OL.21.001768.
- [17] Mark Daly, Marios Sergides, and Síle Nic Chormaic. Optical trapping and manipulation of micrometer and submicrometer particles. *Laser & Photonics Reviews*, 2015. doi: <https://doi.org/10.1002/lpor.201500006>.
- [18] Kishan Dholakia and Peter Reece. Optical micromanipulation takes hold. *Nano Today*, 2006. doi: [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(06\)70019-6](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70019-6).
- [19] Oleg Angelsky, Claudia Zenkova, P.P. Maksymyak, A.P. Maksymyak, and Dmytro Ivanskyi. Controlling and manipulation of red blood cells by evanescent waves. *Optica Applicata*, 2019. doi: 10.37190/oa190406.
- [20] Wenhan Luo, Junliang Xing, Anton Milan, Xiaoqin Zhang, Wei Liu, and Tae-Kyun Kim. Multiple object tracking: A literature review. *Artificial Intelligence*, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.artint.2020.103448>.
- [21] Jean-Yves Tinevez, Nick Perry, Johannes Schindelin, Genevieve M. Hoopes, Gregory D. Reynolds, Emmanuel Laplantine, Sebastian Y. Bednarek, Spencer L. Shorte, and Kevin W. Eliceiri. Trackmate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.09.016>.
- [22] Subhasish Dey, Sk Zeeshan Ali, and Ellora Padhi. Terminal fall velocity: the legacy of stokes from the perspective of fluvial hydraulics. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2019. doi: 10.1098/rspa.2019.0277.
- [23] Jorge Tapia, Carlos Saavedra, and Juan Pablo Staforelli. *Mejora en la resolución espacial en pinzas ópticas dobles mediante uso de correlaciones espaciales*. PhD thesis, Universidad De Concepción, 2020. URL <https://repositorio.udec.cl/handle/11594/628>.

- [24] Thorlabs. Resolution test targets. URL https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4338. (Accedido en Julio de 2024).
- [25] William M. Haynes, editor. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 95th edition, 2014. ISBN 978-1482208689.
- [26] Ivan D. Nikolov and Christo D. Ivanov. Optical plastic refractive measurements in the visible and the near-infrared regions. *Appl. Opt.*, 2000. doi: 10.1364/AO.39.002067.
- [27] David J. Griffiths. *Introduction to Electrodynamics*. Cambridge University Press, 4th edition, 2017. ISBN 978-1108420419.
- [28] Gabriel Ramos, María Luisa Cordero, and Rodrigo Soto. Bacteria driving droplets. *Soft Matter*, 2020. doi: 10.1039/C9SM01839E.
- [29] J. Tapia, N. Vera, J. Aguilar, J. Staforelli, M. González, S. A. Sánchez, Coelho P, and G. Miño. Thermal fluctuation spectroscopy apply to red blood cells membrane: the effect of glucose on the micro rheological properties. *Biophotonics Congress: Biomedical Optics 2020 (Translational, Microscopy, OCT, OTS, BRAIN)*, 2020. doi: 10.1364/TRANSLATIONAL.2020.TW4B.6.
- [30] Bob Fregin, Mohammed Faruq Hossain, Doreen Biedenweg, Virginia Friedrichs, Anne Balkema-Buschmann, Marcel Bokelmann, Kristin Lehnert, Dominic Mokbel, Sebastian Aland, Carsten C. Scholz, Philipp Lehmann, Oliver Otto, and Gerald Kerth. Thermomechanical properties of bat and human red blood cells—implications for hibernation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2024. doi: 10.1073/pnas.2405169121.
- [31] Yanan Wang, Qiuhui Zhang, Zhuan Zhu, Feng Lin, Jiangdong Deng, Geng Ku, Suchuan Dong, Shuo Song, Md Kamrul Alam, Dong Liu, Zhiming Wang, and Jiming Bao. Laser streaming: Turning a laser beam into a flow of liquid. *Science Advances*, 2017. doi: 10.1126/sciadv.1700555.
- [32] Mario Bertolotti, Concita Sabilia, and Angela M. Guzman. *Evanescent Waves in Optics*. Springer Cham, 2017. ISBN 978-3-319-61261-4. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61261-4>.
- [33] Atsushi Nakanishi, Yoichi Kawada, Takashi Yasuda, Koichiro Akiyama, and Hironori Takahashi. Terahertz time domain attenuated total reflection spectroscopy with an integrated prism system. *Review of Scientific Instruments*, 2012. doi: 10.1063/1.3692743.
- [34] Frédéric Caupin and Eric Herbert. Cavitation in water: a review. *Comptes Rendus Physique*, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2006.10.015>.

Apéndice A

A1. Cálculo del ángulo del espejo en términos del índice de refracción de ambos medios y el ángulo del prisma

Para determinar el ángulo al que hay que calibrar el espejo que envía el haz del láser al prisma tal que se genere reflexión interna total, es necesario considerar dos casos relevantes, dependiendo del valor $\theta_p - \theta_c$, donde θ_p corresponde al ángulo interno del prisma y $\theta_c = \sin^{-1}(n_1/n_2)$ es el ángulo crítico entre el prisma y la muestra. En el primer caso, cuando el ángulo $\theta_p - \theta_c$ es positivo, el ángulo restante que el haz forma con el triángulo toma el valor $\pi/2 - \theta_s$, tal como se observa en la siguiente figura:

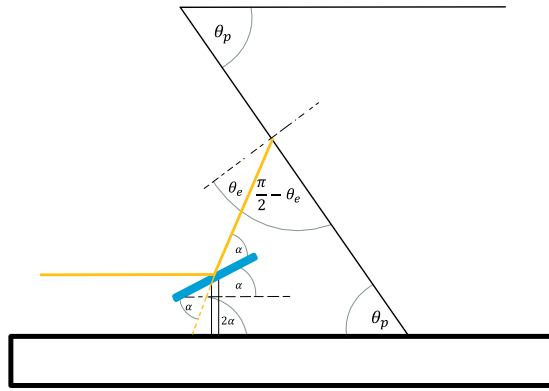


A1. Cálculo del ángulo del espejo en términos del índice de refracción de ambos medios y el ángulo del prisma 57

De la figura, se observa que $\theta_s = \theta_p - \theta_c$, y puesto que $\theta_c = \sin^{-1}(n_m/n_p)$, el ángulo con el que el láser debe incidir al prisma para que ocurre la reflexión total interna viene dado por:

$$\theta_e = \sin^{-1} \left(\frac{n_p \sin(\theta_s)}{n_{air}} \right) = \sin^{-1} \left(\frac{n_p}{n_{air}} \sin(\theta_p - \sin^{-1}(n_m/n_p)) \right) \quad (A1.1)$$

Ahora, lo que se necesita es encontrar la relación entre el ángulo de entrada θ_e y el ángulo del espejo α :



Del diagrama, se observa que la relación entre α y θ_e corresponde a:

$$\alpha = \frac{1}{2} \left(\frac{\pi}{2} + (\theta_e - \theta_p) \right) \quad (A1.2)$$

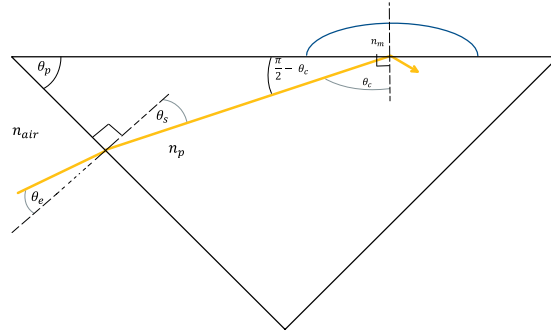
Y por lo tanto la ecuación de α en términos de los parámetros del sistema viene dada por:

$$\alpha = \frac{\pi}{4} + \frac{1}{2} \left(\sin^{-1} \left(\frac{n_p}{n_{air}} \sin(\theta_p - \sin^{-1}(n_m/n_p)) \right) - \theta_p \right) \quad (A1.3)$$

Para el segundo caso, cuando el ángulo $\theta_p - \theta_c$ es menor a 0, la situación dentro del prisma viene dada por:

A1. Cálculo del ángulo del espejo en términos del índice de refracción de ambos medios y el ángulo del prisma

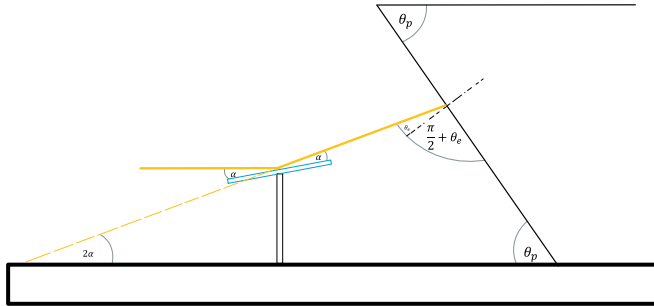
58



De la figura se tiene que $\theta_s = \theta_c - \theta_p$ y puesto que $\theta_c = \sin^{-1}(n_m/n_p)$ se puede calcular en ángulo de incidencia al prisma de la forma:

$$\theta_e = \sin^{-1} \left(\frac{n_p \sin(\theta_s)}{n_{air}} \right) = \sin^{-1} \left(\frac{n_p}{n_{air}} \sin(-\theta_p + \sin^{-1}(n_m/n_p)) \right) \quad (A1.4)$$

En este caso, el diagrama para el laser fuera del prisma viene dado por:



De donde se obtiene la siguiente relación:

$$\alpha = \frac{\pi}{4} - \frac{1}{2}(\theta_e + \theta_p) \quad (A1.5)$$

y al reemplazar θ_e se obtiene:

$$\alpha = \frac{\pi}{4} - \frac{1}{2} \left(\theta_p + \sin^{-1} \left(\frac{n_p}{n_{air}} \sin(-\theta_p + \sin^{-1}(n_m/n_p)) \right) \right) \quad (A1.6)$$

Y por lo tanto, se logro encontrar un conjunto de expresiones que permite determinar fácilmente como calibrar el ángulo α que hay que darle al espejo en función de los parámetros del sistema. Eso sí, es posible simplificar las expresiones

para α aún más. Para esto, escribimos ambas expresiones una al lado de la otra:

$$\begin{aligned}\alpha_1 &= \frac{\pi}{4} + \frac{1}{2} \left(\sin^{-1} \left(\frac{n_p}{n_{air}} \sin (\theta_p - \sin^{-1} (n_m/n_p)) \right) - \theta_p \right) \\ \alpha_2 &= \frac{\pi}{4} - \frac{1}{2} \left(\sin^{-1} \left(-\frac{n_p}{n_{air}} \sin (\theta_p - \sin^{-1} (n_m/n_p)) \right) + \theta_p \right)\end{aligned}$$

De donde se puede observar claramente que es posible compactarlas en una sola expresión de la forma:

$$\alpha_{\pm} = \frac{\pi}{4} \pm \frac{1}{2} \left(\sin^{-1} \left(\pm \frac{n_p}{n_{air}} \sin (\theta_p - \sin^{-1} (n_m/n_p)) \right) \mp \theta_p \right) \quad (\text{A1.7})$$

Donde el signo \pm viene determinado por el signo de: $\theta_p - \theta_c$.

Aún más, como \sin^{-1} es una función impar, tenemos que es posible reescribir ambos casos como una única función de la forma:

$$\alpha = \frac{\pi}{4} + \frac{1}{2} \left(\sin^{-1} \left(\frac{n_p}{n_{air}} \sin (\theta_p - \sin^{-1} (n_m/n_p)) \right) - \theta_p \right) \quad (\text{A1.8})$$

Y por lo tanto, independiente del valor de $\theta_p - \theta_c$, la ecuación [A1.8](#) nos permite fácilmente encontrar el valor que hay que darle a α para obtener la condición de ángulo crítico.

A2. Coalescencia y ruptura de microgotas

Durante el desarrollo de los experimentos se observó un fenómeno que si bien se escapa de los objetivos de la tesis, puede ser de interés para la realización de otro trabajo. En particular, corresponde a un comportamiento que se observó cuando el láser utilizado para desplazar las partículas incidía dentro de alguna burbuja de aire atrapada en la muestra. Lo que se observa se ve descrito en la figura [A2.1](#).

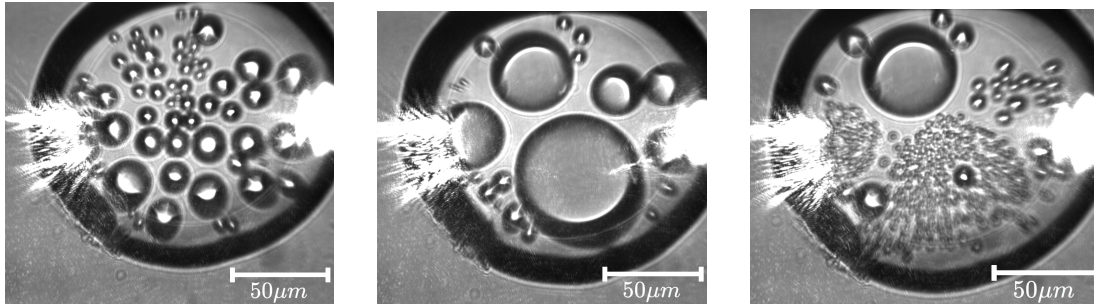


Figura A2.1: Láser sobre una burbuja de aire, el que induce la generación de gotas de agua (izquierda), las que crecen y fusionan (centro) hasta eventualmente colapsar y formar una multitud de gotas de menor tamaño (derecha).

En esta figura se puede observar cómo al incidir el láser en la burbuja de aire, esta comienza la generación de estas gotas de agua que crecen progresivamente, se fusionan entre ellas hasta que se vuelven tan grande que colapsan en una multitud de gotas más pequeñas, las que repiten periódicamente el ciclo mientras se siga iluminando la burbuja de aire. Experimentando con este fenómeno se identificó que al aumentar la intensidad del láser aumentaba la rapidez del proceso, el cual se detenía completamente al apagar el láser. Una acotada búsqueda bibliográfica no logro identificar ningún trabajo donde se describiera un fenómeno similar, por lo que puede resultar de interés realizar una caracterización mas detallada del fenómeno.