



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico Matemáticas

Diseño y construcción de un prototipo de microscopio
pticográfico.

Tesis presentada al

Colegio de Física

como requisito parcial para la obtención del grado de

LICENCIADO EN FÍSICA APLICADA

por

Marian Sosa Mendoza

Asesorada por

MC. Luis Alberto Rendón Delgado

Dr. Carlos Ignacio Robledo Sánchez

Puebla, Pue.
Septiembre 2024



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico Matemáticas

Diseño y construcción de un prototipo de microscopio
pticográfico.

Tesis presentada al

Colegio de Física

como requisito parcial para la obtención del grado de

LICENCIADO EN FÍSICA APLICADA

por

Marian Sosa Mendoza

Asesorada por

MC. Luis Alberto Rendón Delgado
Dr. Carlos Ignacio Robledo Sánchez

Puebla, Pue.
Septiembre 2024

Título: Diseño y construcción de un prototipo de microscopio
pticográfico.

Estudiante: MARIAN SOSA MENDOZA

COMITÉ

Dr. Alberto Cordero Dávila
Presidente

Dr. Maximino Luis Arroyo Carrasco
Secretario

Dra. Barbara Emma Sánchez Rinza
Vocal

Dr. Ricardo Agustín Serrano
Suplente

MC. Luis Alberto Rendón Delgado
Asesor

Dr. Carlos Ignacio Robledo Sánchez
Asesor

Agradecimientos

Agradezco con todo mi corazón a mi familia, quienes me apoyaron y alentaron en todo momento. Es a ustedes a quienes les dedico mi esfuerzo y mi trabajo, gracias por escucharme incontables veces, a enseñarme a creer en mí. Gracias Gesi, Nabor Dani, Vicks, Manchita y gatalditos, sin ustedes no lo hubiera logrado.

Agradezco a mis amigos de la carrera, del laboratorio de Interferometría & Holografía, y de la vida, cada uno de ustedes me brindo su apoyo en los momentos más oportunos.

A los chicos del equipo *Super Oso*, por ser un equipo increíble, que respalda mi trabajo y cuida de nuestro Osito con tanta diligencia.

Deseo también, agradecer profundamente a mis asesores el M.C Luis Alberto Rendón Delgado, por compartir su conocimiento siempre con la mejor actitud y disposición, invitándome siempre a la reflexión y al ingenio. Y al Dr. Carlos Ignacio Robledo Sánchez, quien no solo me compartió su conocimiento académico sino también palabras de aliento y un par de sabios consejos sobre la vida. Asesores, su apoyo me ha guiado hasta aquí, muchas gracias por todo.

Finalmente, agradezco al jurado de mi tesis por su dedicación, tiempo y valiosas observaciones. Gracias por guiarme con su experiencia y por mantenerme en un estándar de excelencia que buscaré mantener en mi futuro desarrollo académico y profesional. Con un agradecimiento especial al Laboratorio de Impresión 3D de la FCFM, perteneciente a la Facultad Ciencias Físico Matemáticas, por el apoyo y la asistencia técnica brindados.

Índice general

Resumen	IX
Introducción	X
1. Antecedentes	2
1.0.1. Hipótesis	2
1.0.2. Objetivos	2
2. Marco Teórico.	4
2.1. El Microscopio	4
2.1.1. Amplificación o potencia de aumento.	4
2.1.2. Campo de visión	6
2.1.3. Poder de resolución.	6
2.1.4. Abertura numérica.	6
2.1.5. Microscopía y tipos de microscopios.	7
2.1.6. Teoría de Abbe	8
2.1.7. Microscopía de fase	8
2.2. El problema de fase.	12
2.2.1. Fase óptica	12
2.3. Difracción	13
2.3.1. Difracción en un microscopio.	14
2.3.2. Interferencia	14
2.4. La Transformada de Fourier.	16
2.4.1. Frecuencias espaciales	16
2.4.2. Transformada de Fourier	18
2.4.3. Transformada de Fourier en 2 dimensiones	18
2.5. Imágenes computacionales	19
2.5.1. Teorema de Nyquist.	20
2.6. HDR	20
2.7. Pticografía de Fourier	22
3. Metodología	26
3.1. Prototipo experimental	26
3.1.1. Sistema de iluminación	26
3.1.2. Muestras delgadas	27
3.1.3. Patrones de resolución	28
3.1.4. Objetivo de microscopio	28
3.1.5. Detector	29
3.2. Implementación	29
3.2.1. Diseño mecánico del microscopio	29
3.2.2. Proceso de captura.	34

3.3. Algoritmo iterativo de pticografía de Fourier.	42
3.3.1. Parámetros físicos y porcentaje de plegado	49
4. Resultados y discusión	50
4.0.1. Patrones de resolución	50
5. Conclusión	65
A. Código del algoritmo PF implementado.	66
A.0.1. Algoritmos auxiliares para el proceso de captura de las imágenes de baja resolución.	69
Bibliografía	73

Índice de figuras

2.1. Esquema de un microscopio compuesto simplificado.[Tomado del Hecht Cap.5 Figura 5.110 pp.219]	5
2.2. La abertura numérica es la cantidad de luz que el objetivo puede captar.	7
2.3. Fase y amplitud representadas gráficamente	9
2.4. Retraso de una onda de luz producida por una partícula (P) de mayor índice de refracción que sus alrededores (S)	9
2.5. Mayor contraste de amplitudes a partir de diferencias de fase.	10
2.6. Diagrama del camino de la luz a través de un microscopio de fase [Diagrama tomado del libro Introduction to phase microscopy. Alva Bennet (1951) pp. 10]	11
2.7. Distorsión de una parte del frente de onda al pasar a través de un material de espesor no uniforme. Tomado del Óptica Hecht, E. Capitulo 4, pp 107.	14
2.8. Distribución bidimensional de irradiancia.	17
2.9. Paradigma de la imagen computacional. a) Un microscopio convencional. b) Los errores en los elementos ópticos se corrigen en el post procesamiento. c) Los errores en las ópticas se miden en un plano detector. Luego, las ópticas variables se ajustan para mejorar la imagen mediante un cálculo de retroalimentación. d) Pticografía. [Diagrama tomado del libro Springer handbook of microscopy. Holography, Ptychography and Diffraction. John Rodenburg (2019) pp. 820]	20
2.10. Configuración general de una escena interior con una ventana.	21
2.11. Seis imágenes de la misma escena capturadas con diferentes tiempos de exposición. Imágenes tomadas de la documentación de Matlab. Ver make_hdr .	22
2.12. Imagen HDR obtenida.	22
2.13. Diagrama simplificado de cómo funciona el algoritmo de Pticografía de Fourier.	24
3.2. Rejilla ronchi 40 líneas por mm	28
3.1. Retícula II E-13B	28
3.3. Sistema de enfoque.	30
3.4. Modelo para bases en acrílico.	32
3.5. Modelo para bases en MDF.	32
3.6. Prototipo fabricado en acrílico.	33
3.7. Prototipo fabricado en MDF.	34
3.8. Secuencia de encendido para imágenes sin procesar	35
3.9. Zonas de captura con diferentes vectores de tiempos de exposición	36
3.10. Conjunto de imágenes para el patrón de resolución de matriz 7×7 LEDs, con HDR.	38
3.11. Conjunto de imágenes para el patrón de resolución de matriz 7×7 LEDs, sin procesamiento.	39
3.12. Conjunto de imágenes para la rejilla con la matriz 7×7 LEDs, sin procesamiento.	39
3.13. Secuencia de encendido en la matriz 64×64 LEDs	40
3.14. Conjunto de imágenes de matriz 3×3 .	41
3.15. Esquema del vector de onda k , proveniente del n -ésimo LED. (Representativo).	43

3.16. Calcular el ángulo θ , a partir de los parámetros del microscopio.	43
3.17. El factor de submuestreo define cuántas veces crecerá el número de píxeles en una dimensión respecto a la imagen de baja resolución.	44
3.18. Objeto estimado.	46
3.19. Espectro aproximado.	46
3.20. Selección de un área correspondiente a una imagen de baja resolución.	47
3.21. Objeto aproximado de la región escogida en el espacio de frecuencias.	47
3.22. Proyección de alternada.	48
3.23. Espectro de Fourier sintético.	48
4.1. Imagen central muestra rejilla	51
4.3. Imágenes recuperadas de alta resolución para la rejilla de Ronchi.	51
4.2. Espectro de Fourier sintético para la rejilla de Ronchi.	52
4.4. Imagen de baja resolución bajo iluminación normal.	53
4.5. Espectro de Fourier sintético para el patrón de resolución.	53
4.6. Imágenes recuperadas de alta resolución para la retícula II 13-B.	54
4.8. Espectro de Fourier para la retícula ocupando una matriz de 3×3 LEDs.	55
4.7. Imagen de baja resolución bajo iluminación normal.	55
4.9. Imágenes recuperadas de alta resolución para la retícula II 13-B, matriz 3×3 LEDs.	56
4.10. Imagen de baja resolución bajo iluminación normal.	57
4.11. Espectro de Fourier obtenido a partir de imágenes con HDR.	57
4.12. Imágenes recuperadas de alta resolución para la retícula II 13-B, zona cuadros.	58
4.13. Imagen de baja resolución proporcionada por el LED central.	59
4.14. Espectro de Fourier para un ala de libélula.	59
4.15. Imágenes recuperadas de alta resolución para la ala de libélula.	60
4.16. Imagen de baja resolución obtenida mediante el LED central.	61
4.17. Espectro de Fourier sintético para la muestra de piel de manzana.	61
4.18. Imágenes recuperadas de alta resolución para la piel de manzana con el objetivo de $4x$	62
4.20. Espectro de Fourier sintético para la muestra de piel de manzana con el objetivo de $0.25x$	63
4.19. Imagen de baja resolución correspondiente al LED central.	63
4.21. Imágenes recuperadas de alta resolución para la muestra de piel de manzana $10x$	64

Índice de tablas

2.1. Distintos objetivos comerciales con sus respectivas características	7
3.1. Longitud de onda para cada color de LED Matriz 8×8	27
3.2. Longitud de onda para cada color de LED Matriz 64×64	27

Resumen

Los microscopios ópticos son esenciales para diversas aplicaciones científicas, médicas e industriales debido a su costo accesible y fácil manejo. Sin embargo, su capacidad de amplificación y resolución espacial está limitada por la abertura numérica (NA) de sus componentes ópticas. Los objetivos de microscopio de baja NA, aunque son económicos, ofrecen la menor resolución. Además, los microscopios ópticos no pueden obtener la fase óptica de las muestras, lo que limita la información sobre su estructura espacial. La recuperación de esta información puede realizarse mediante métodos cualitativos o cuantitativos, siendo el microscopio de contraste de fase un ejemplo cualitativo. Los métodos cuantitativos, como la holografía o la interferometría, emplean configuraciones experimentales complejas y altamente sensibles.

La pticografía de Fourier ofrece una solución para obtener imágenes de intensidad y fase simultáneamente sin necesidad de implementar arreglos experimentales complejos ni instrumentación costosa. Esta técnica utiliza componentes ópticos de bajo costo y algoritmos computacionales para mejorar la resolución de las imágenes. Actualmente, no existe ningún microscopio comercial que emplee esta técnica, por lo que se propone diseñar un prototipo asequible capaz de generar imágenes de alta resolución tanto de amplitud como de fase, junto con un algoritmo desarrollado en Matlab. El trabajo consistió en desarrollar un arreglo experimental de un microscopio simple que implementa la técnica de pticografía de Fourier, una innovadora técnica de microscopía computacional que permite obtener imágenes de alta resolución y determinar la fase óptica de muestras delgadas a partir de un espectro sintético de Fourier calculado con un algoritmo auto-convergente, el cual utiliza un conjunto de imágenes de la muestra iluminada desde diferentes ángulos.

Esta investigación presenta los detalles del diseño y fabricación de un microscopio pticográfico de Fourier, desde el diseño mecánico realizado en un software especializado hasta la estandarización de los parámetros físicos del diseño opto-mecánico del microscopio, abordando la programación de la fuente de iluminación empleada y el estudio e implementación del algoritmo computacional de PF.

El prototipo observó dos tipos de muestras: patrones de resolución y muestras biológicas delgadas. Se analizan y discuten las imágenes recuperadas para el primer grupo de muestras. Para las cuales el prototipo diseñado se considera funcional, debido a que logra recuperar la fase esperada para dichas muestras de manera satisfactoria. Así mismo se realiza análisis y discuten las imágenes recuperadas del segundo conjunto de muestras, para las cuales el prototipo no demostró eficiencia y se discuten las posibles causas de este resultado. El microscopio fabricado se concibe como el primer paso para el desarrollo de nueva tecnología basada en la técnica de pticografía de Fourier que será versátil para diversas áreas de la ciencia, permitiendo la observación de una amplia variedad de muestras delgadas con un alto nivel de detalle.

Palabras clave: *Pticografía, Algoritmo autoconvergente, difracción, interferencia, Transformada de Fourier.*

Introducción

Los microscopios ópticos son instrumentos indispensables para una amplia variedad de quehaceres científicos, médicos e industriales, su accesibilidad en términos de costo y manejo les otorgan su valía incuestionable. Sin embargo, a pesar de su gran utilidad están limitados en su capacidad de amplificación y resolución espacial, siendo su principal limitante la abertura numérica (NA) de su objetivo. Los objetivos de baja NA que a menudo son de bajo costo y por lo tanto los más fáciles de conseguir para la mayoría de las instituciones, son también los que proporcionarán la resolución más baja. Otra desventaja intrínseca a los microscopios ópticos (Como todos los dispositivos que se tienen para medir el campo eléctrico) es su incapacidad de obtener la fase óptica de las muestras, es decir de toda la información de su estructura espacial.

La recuperación de esta información de fase perdida en el momento de la detección, puede realizarse a través de métodos cualitativos o cuantitativos. El microscopio de contraste de fase es un buen ejemplo de un método cualitativo; capaz de obtener imágenes de la estructura de organismos transparentes. Sin embargo, cuando se desea recuperar la fase a través de métodos cuantitativos, la tarea se vuelve más compleja y requiere, a menudo, de complicadas y delicadas configuraciones experimentales, como las que se necesitan en holografía o interferometría, ([1], [2]).

La pticografía de Fourier, surge cómo una solución a la problemática de obtener imágenes de intensidad y de fase de manera simultánea, sin una configuración experimental compleja o instrumentos ópticos costosos, ofreciéndonos en el proceso la capacidad de mejorar la resolución de las imágenes obtenidas gracias a su naturaleza computacional.

La pticografía de Fourier (PF), fue implementada y documentada por primera vez en un microscopio en 2013 por Guoan Zheng et al, en su artículo "Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy". La PF es una novedosa técnica de microscopía que nos permite extender las capacidades de un microscopio más allá de las limitaciones físicas de su óptica a través de un algoritmo computacional, [3]. La palabra pticografía proviene del griego "Ptycho" que significa "plegado" o "doblez" y "grafía" también del griego, significa "escritura", "dibujo" o "representación". En efecto, la pticografía de Fourier (PF) utiliza el plegado de patrones de difracción provenientes de iluminar una muestra desde distintos ángulos para dar lugar a dos imágenes de alta resolución, una de fase y otra de amplitud, [4].

Además, con el plegado de los patrones de difracción en el espacio frecuencial por medio de un algoritmo de recuperación de fase, la PF nos proporciona una manera sintética de aumentar la abertura numérica de un objetivo, lo que trae como consecuencia aumentar la resolución espacial de las imágenes obtenidas, y cómo ventaja adicional permitiéndonos conservar el amplio campo de visión de un objetivo de baja resolución, dando como resultado una de las combinaciones más difíciles de encontrar en la microscopía; un amplio campo de visión y una muy alta resolución, [5].

Desde 2013 y hasta la fecha, se han construido prototipos de microscopios que ocupan la técnica, destacando en todos ellos el bajo costo que se necesita para construirlo, ya que las modificaciones que requiere el hardware son mínimas, así como el costo computacional, ([3],[6] [7]).

En este trabajo experimental, se detalla el proceso de diseño y construcción de un prototipo de microscopio pticográfico de Fourier, que nos brinde la oportunidad de poner a prueba la técnica de PF, y demostrar su funcionalidad y eficacia en la observación de muestras delgadas, contemplando para su diseño, la configuración experimental empleada en la literatura.

Los resultados del trabajo demuestran, para los elementos ópticos empleados, un correcto funcionamiento para muestras con detalles de hasta 0.2032 mm en la recuperación de imágenes de amplitud y fase, para las cuales se obtiene un resultado satisfactorio. En contraposición se obtuvieron las pruebas realizadas con muestras biológicas cuyos detalles rondan los $10\mu\text{m}$, en el caso de las células del cerebro de ratón, los resultados no fueron los esperados, las imágenes recuperadas a través del algoritmo de PF, son de muy baja calidad, teniendo como factor predominante demasiado ruido para hacer distinguible la imagen de la muestra. Estos resultados impiden denominar funcional en este tipo de muestras al prototipo presentado.

El prototipo es versátil ya que ofrece la posibilidad de trabajar con diferentes configuraciones para adquirir las imágenes a diferentes alturas de fuente de iluminación-muestra, de las cuales se probaron desde 10 cm hasta 25 cm , sin tener resultados mejores para las muestras biológicas. Se infiere que el fallo del prototipo en este tipo de muestras es debido a las características físicas de la fuente de iluminación utilizada, ya que afecta directamente la cantidad de imágenes de iluminación oblicua y el ángulo al que las imágenes de la muestra, a partir de las cuales se obtienen sus patrones de difracción, deteriorando la calidad de las imágenes. El microscopio fabricado sienta las bases y da el primer paso para el desarrollo de nueva tecnología basada en la técnica de pticografía de Fourier que será versátil en diversas áreas de la ciencia como la medicina, la biología, la química, etc., permitiendo la observación de una amplia variedad de muestras delgadas con un alto nivel de detalle.

Capítulo 1

Antecedentes

A lo largo de los años los científicos han buscado la forma de construir mejores microscopios y mejorar las técnicas de adquisición de imágenes. Durante muchos años, la respuesta fue fabricar una o más lentes con la mayor precisión posible y disponerlas en la columna de un microscopio con la mayor precisión posible, [4]. Gracias a la llegada de las computadoras, se creó el paradigma de la imagen computacional, el cual nos permite obtener imágenes de buena calidad sin necesidad de detectar una imagen como tal.

La pticografía es un nuevo método de imagen computacional en dónde la calidad de los instrumentos ópticos y la precisión de su disposición en el arreglo experimental no definen la calidad de la imagen. Su poder radica en su algoritmo iterativo autoconvergente, capaz de recuperar la fase óptica del objeto, a través de las funciones de transformada de Fourier y transformada de Fourier inversa. Fue concebida originalmente por primera vez en la literatura, por los autores alemanes Hegerl y Hoppe en el año de 1970, quienes estudiaban el problema de fase cristalografica a través de difracción de electrones. En su artículo "Dynamische Theorie der Kristallstrukturanalyse durch Elektronenbeugung im inhomogenen Primärstrahlwellenfeld", ellos documentaron este método para adquirir imágenes de información completa (Amplitud y fase) alternativo a la holografía, [8].

El interés en esta técnica perdió fuerza debido a las limitaciones de procesamiento computacional que se tenían en esa época. Décadas más tarde, a principios del siglo XXI, y con la llegada de mejores equipos de computo, Rodenburg, et al., utilizaron la técnica de pticografía de Fourier, para la obtención de imágenes de alta resolución con microscopía de rayos x.

La implementación de esta técnica no se llevo a cabo hasta hace poco más de una década, que el doctor Guoan Zheng, et al, incursionó en el estudio y caracterización de un microscopio de pticografía de Fourier, detallando su metodología en sus numerosos artículos, generando así el primer prototipo que emplea esta técnica, [5].

1.0.1. Hipótesis

La técnica de microscopía denominada pticografía de Fourier nos permite extender las capacidades de un microscopio más allá de las limitaciones físicas de su óptica, es decir nos permitirá trabajar con elementos de bajo costo y obtener imágenes como si se hubieran utilizado elementos ópticos más sofisticados. Por lo tanto, se propone poner a prueba la técnica a través del diseño de un microscopio de bajo costo que tenga como objetivo principal la observación de muestras delgadas.

1.0.2. Objetivos

Objetivo general

Se busca diseñar un microscopio que ocupe la técnica de pticografía de Fourier para visualizar imágenes de amplitud y fase, las cuales cuenten con alta resolución y un amplio campo de visión. Además se llevó a cabo la fabricación de los elementos mecánicos del microscopio a partir de materiales de bajo costo, y realizar la caracterización para observar muestras delgadas.

Objetivos específicos

1. Estudiar la técnica de Pticografía de Fourier para fabricar un microscopio funcional.
2. Realizar el diseño y modelado de una estructura sólida y robusta para que sea el soporte mecánico de nuestro microscopio.
3. Realizar el algoritmo computacional necesario para el funcionamiento del instrumento a fabricar.
4. Realizar los algoritmos auxiliares necesarios para el proceso de capturar las imágenes.

Capítulo 2

Marco Teórico.

2.1. El Microscopio

La palabra microscopio deriva del griego $\mu\kappa\rho\sigma$ = pequeño y $\sigma\kappa\omicron\pi\epsilon\upsilon$ = ver. Un microscopio es un instrumento que nos permite observar objetos muy pequeños que a simple vista el ojo humano es incapaz de ver. Esta herramienta produce una imagen real invertida gracias a un conjunto de lentes el cuál le permite realizar una **amplificación** muy grande del objeto observado.

2.1.1. Amplificación o potencia de aumento.

La amplificación o potencia de aumento puede ser descrita como la relación que existe entre el tamaño de la imagen vista con el instrumento y su tamaño visto directamente.

$$M = -\frac{S_i}{S_o} \quad (2.1)$$

El signo negativo en la ecuación 2.1 nos indica que la imagen está invertida. Anton van Leeuwenhoek, científico y comerciante neerlandés, es considerado el padre del microscopio simple, este microscopio consta de una sola lente y no es muy diferente a la lupa, su diferencia radica en su capacidad de amplificación. El microscopio simple requiere una lente con un radio de curvatura pequeño para garantizar una distancia focal pequeña de igual forma. Aún con un radio de curvatura diminuto, éste microscopio no superará un par de decenas de amplificación, y además, se producirán múltiples aberraciones que dañarán la imagen del objeto que se desea observar. Si se requiere una mayor amplificación y eliminar las aberraciones de la imagen, se necesita recurrir al microscopio compuesto.

Un microscopio compuesto consta de dos lentes; **objetivo** y **ocular**. El **objetivo** es el sistema esencial de todo instrumento, y su función no es únicamente amplificar el objeto, si no que además deberá dar una buena imagen y resolución, [2]. Por esta razón los objetivos comerciales regularmente cuentan con más de una lente que les permite corregir diferentes tipos de aberraciones en la imagen. Por otro lado el **ocular** actúa como una lupa para visualizar de manera cómoda la imagen proporcionada por el objetivo.

La amplificación de un microscopio compuesto se obtiene multiplicando la amplificación del objetivo dada por,

$$M_{\text{objetivo}} = -L/f_{\text{objetivo}} \quad (2.2)$$

donde L representa la distancia entre la imagen del objetivo y el punto focal posterior del mismo, y f_{ocular} representa la distancia focal de la lente, por la amplificación del ocular,

$$M_{\text{ocular}} = \frac{250}{f_{\text{ocular}}} \quad (2.3)$$

donde f_{ocular} es la distancia focal del ocular. De tal manera que la amplificación producida por el microscopio compuesto queda como

$$M = M_{\text{objetivo}} * M_{\text{ocular}} \quad (2.4)$$

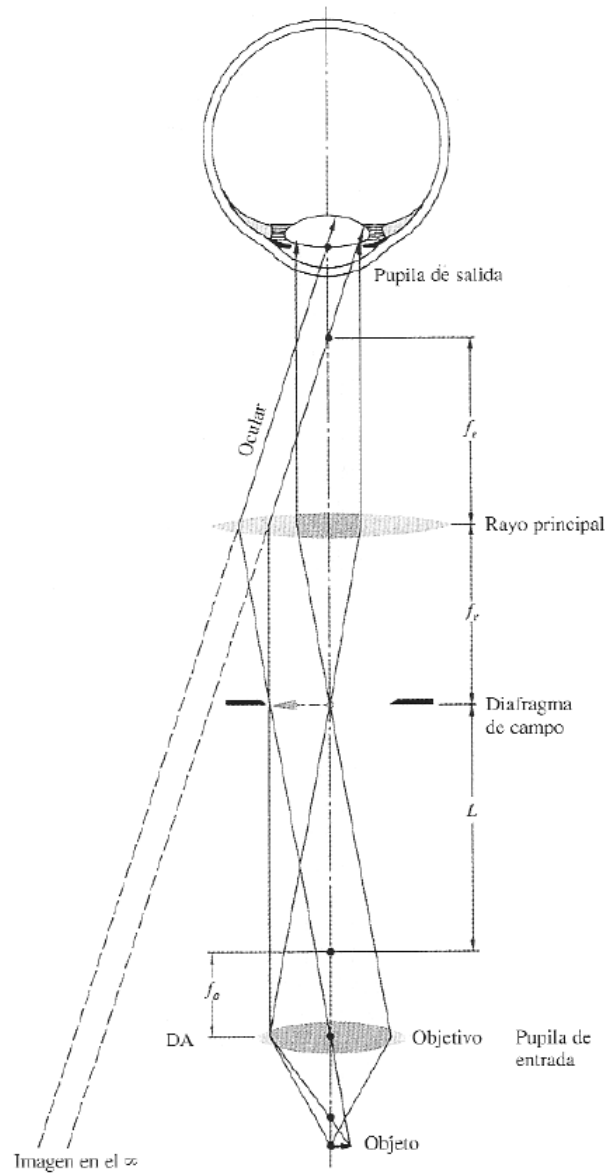


Figura 2.1: Esquema de un microscopio compuesto simplificado.[Tomado del Hecht Cap.5 Figura 5.110 pp.219]

La **amplificación total efectiva** o amplificación total del microscopio será determinada por el tipo de observación que se empleó en el microscopio, (el ojo humano o una cámara, por ejemplo) puesto que proporcionar una mayor amplificación de la que “el observador” puede resolver nos daría como resultado una amplificación vacía y podría producir efectos indeseables en la imagen, [2]. Por ejemplo, el detector CCD utilizado para esta investigación nos brinda el poder de resolución de hasta $5\mu m$ por lo tanto si se utilizan instrumentos ópticos que produzcan imágenes con detalles más finos que esta dimensión, estos no tendrán ningún efecto en el observador. La amplificación total se expresa como

$$\text{Amplificación total} = \frac{\text{Limite de resolución del observador}}{\text{Limite de resolución del objetivo}} \quad (2.5)$$

La distancia L denotada en la figura 2.1 es un parámetro conocido en la literatura como “la longitud del tubo” y es la distancia entre el foco posterior del objetivo hasta el foco anterior del ocular (muy cercano a la imagen del objetivo), esta longitud está estandarizada para la mayoría de objetivos y es de 160 mm.

2.1.2. Campo de visión

Al ángulo cónico subtendido desde el centro de la *pupila de salida* (imagen formada por el cono de luz que sale del sistema óptico) por la periferia de la ventana de salida (imagen del diafragma de campo) se denomina *campo angular de visión en el espacio imagen*, [9]. En palabras sencillas el campo de visión es toda el área de la imagen brindada por el microscopio.

2.1.3. Poder de resolución.

Como se mencionó, el objetivo es una parte fundamental del microscopio, es este componente el que determinará el **poder de resolución** del microscopio. Este término es el que define cuántos detalles finos seremos capaces de ver en la imagen. En palabras del Dr. A. Cornejo *Resolución* significa qué puntos muy cercanos del objeto observado (de por sí diminuto) puedan ser observados de forma nítida. Es la capacidad para dar una imagen fiel del objeto"

Esta determinado por

$$d = \frac{1.22\lambda}{2n \sin \theta} \quad (2.6)$$

o bien simplificando,

$$d = \frac{0.61\lambda}{n \sin \theta} \quad (2.7)$$

donde θ es el ángulo máximo por el cuál podrán pasar los rayos de luz a través del objetivo y n el índice de refracción del medio.

Se debe tener en mente que para un microscopio óptico, y en general cualquier sistema óptico formador de imágenes, la perfección de estas últimas siempre estarán limitadas por la **difracción**. Esto quiere decir que *siempre habrá una mancha borrosa, puesto que la imagen de una fuente puntual distante formada por una lente convergente perfectamente libre de aberraciones nunca es un punto, sino más bien un tipo de figura de difracción*, [10]. El tema de la difracción, así como la deducción de la ecuación 2.7 será abordado más adelante en este trabajo. El no poder poseer una copia cien por ciento fidedigna del objeto se debe principalmente al carácter finito de la longitud de onda de la luz y al contar con una abertura numérica limitada del sistema, [12].

2.1.4. Abertura numérica.

Al término $n \sin \theta$ se le conoce como abertura numérica, la cual define el rango de ángulos de iluminación que pueden pasar a través de la lente, y determinará la capacidad de resolución que tendrá éste. (Figura 2.2). En este trabajo la abertura numérica es considerada una función de transferencia del objetivo.

Objetivos		
Amplificación	Distancia focal en mm	N.A
3X	40	0.08
4X	27	0.10
5X	16	0.12
10X	16	0.25
20X	8	0.50
43X	4	0.65
97X	1.8	1.25

Tabla 2.1: Distintos objetivos comerciales con sus respectivas características

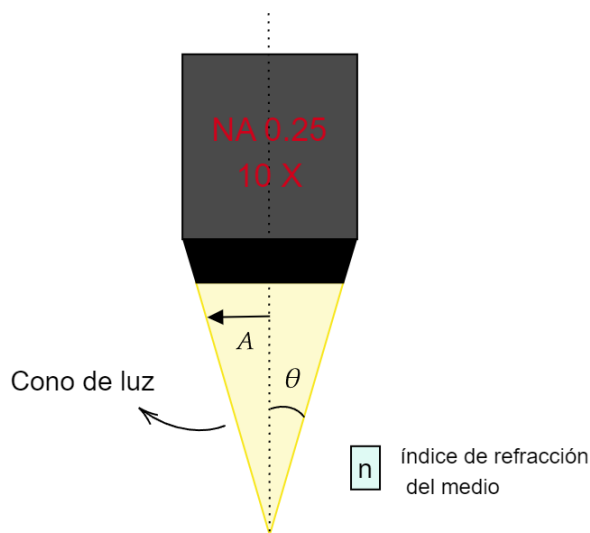


Figura 2.2: La apertura numérica es la cantidad de luz que el objetivo puede captar.

Una apertura numérica $NA < 1$ se relaciona, con objetivos diseñados para trabajar en el aire con un índice de refracción $n = 1$ (objetivos secos), mientras que objetivos con una apertura numérica $NA > 1$ están fabricados para trabajar en un medio con índice de refracción $n > 1$ como el aceite (objetivos de inmersión).

Se le proporciona al lector en la tabla 2.1 con las ampliificaciones y NA de los objetivos comerciales que se pueden encontrar en el mercado.

2.1.5. Microscopía y tipos de microscopios.

La microscopía es una técnica científica que estudia los microscopios. En biología, el microscopio óptico ha sido una herramienta indispensable desde la época de van Leeuwenhoek, con numerosas mejoras incrementales, [4]. Los microscopios ópticos son aquellos que utilizan ondas electromagnéticas en el espectro visible, es decir, luz, para iluminar las muestras a observar. Dentro de esta categoría, se encuentran, por ejemplo; el microscopio simple, el cuál consta de una sola lente para amplificar las muestras, el microscopio compuesto, que hace uso de dos lentes y el microscopio confocal, cuya iluminación de la muestra es a base de luz láser. Los microscopios pueden clasificarse

en general, en dos tipos, aquellos que obtienen solo imágenes de intensidad (microscopía convencional) y aquellos que obtienen imágenes de amplitud y fase (microscopía de fase) recordando que la amplitud está relacionada con la intensidad por

$$I = A^2. \quad (2.8)$$

2.1.6. Teoría de Abbe

Ernest Abbe, científico alemán quién trabajaba en Carl Zeiss diseñando microscopios en el siglo XIX, se percató que entre más grande era el diametro de la lente objetivo, la imagen producida por esta mejoraba su nitidez y resolución. Sin embargo desde la teoría de la óptica geométrica esto no era sencillo de explicar. Al tener una lente de mayor diametro si bien aumentaba la cantidad de luz que el instrumento podía captar, esto solo debería repercutir en la intensidad de luz de la imagen, y no en su resolución. Así, Abbe propuso su teoría; La luz utilizada para iluminar el objeto y que posteriormente se dispersa (difracta) al atravesar el mismo, contiene información sobre las características del material, tales como su estructura. Cuando estos rayos de luz son dispersados a diferentes ángulos, algunos de ellos son demasiado oblicuos respecto al eje óptico para ser capturados por la lente objetivo. La pérdida de esta luz trae como consecuencia la ausencia de la información que estaba contenida en esa luz, y de esta manera se explica la pérdida de resolución. Su teoría sentó las bases para el campo de la óptica de Fourier, y permitió el desarrollo de instrumentos como el microscopio de contraste de fases y de campo oscuro.

Los experimentos de Abbe fueron los primeros en reportar los efectos de introducir cambios de fase de la luz dentro del sistema óptico de un microscopio [12].

2.1.7. Microscopía de fase

Hasta ahora no se han abordado las características que deben tener los objetos o muestras, para ser observados correctamente en el microscopio, y se debe suponer que estos están debidamente preparados para su análisis. Sin embargo, en la práctica, es común observar muestras biológicas, como tejidos, que deben ser preparados previamente para su correcta observación, con tintes y solventes. En este contexto, existen una gran variedad de muestras biológicas para las cuales, dichos elementos químicos son letales, por ende es imperante poseer diferentes métodos que posibiliten la observación al microscopio de objetos que no permitan su observación sin una preparación previa. Usualmente a este tipo de muestras se les denomina objetos transparentes. Para realizar el análisis de este tipo de muestras surgieron técnicas de observación alternativas a la de *campo claro* (Término designado para la forma de observación convencional en un microscopio). Entre ellas destacan las de campo oscuro, contraste de fase, polarización y contraste de interferencia, [2]. Por mencionar algunas, y cada una de ellas hace uso de diferentes sistemas ópticos. Este capítulo abordará la microscopía de fase de manera breve para dar una idea al lector de su funcionamiento.

Pesé a que Abbe es a quién le debemos la idea fundamental para desarrollar este tipo de microscopía, es a Frederick Zernike a quién le debemos la primera aplicación de los principios de contraste de fase en un microscopio. Su trabajo le valió el premio Nobel en 1953.

Dato curioso: La patente del microscopio de contraste de fase no le fue concedida, sino que le perteneció a la empresa Carl Zeiss.

La microscopía de fase, como se mencionó anteriormente es utilizada comúnmente para especímenes demasiado transparentes para un examen efectivo con otros tipos de microscopía, [12].

Las ondas, en general, poseen dos propiedades matemáticas; **amplitud** y **fase**. La amplitud nos brinda la altura que existe de la punta de una cresta de la función hasta el eje x. La fase, en cambio, describe en que posición espacial y temporal se encuentra esa onda de luz. Ambas

propiedades se han esquematizado en la Figura 2.3. Las ondas de luz, también poseen dichos elementos. La microscopía de fase está basada en la combinación de estas ondas.

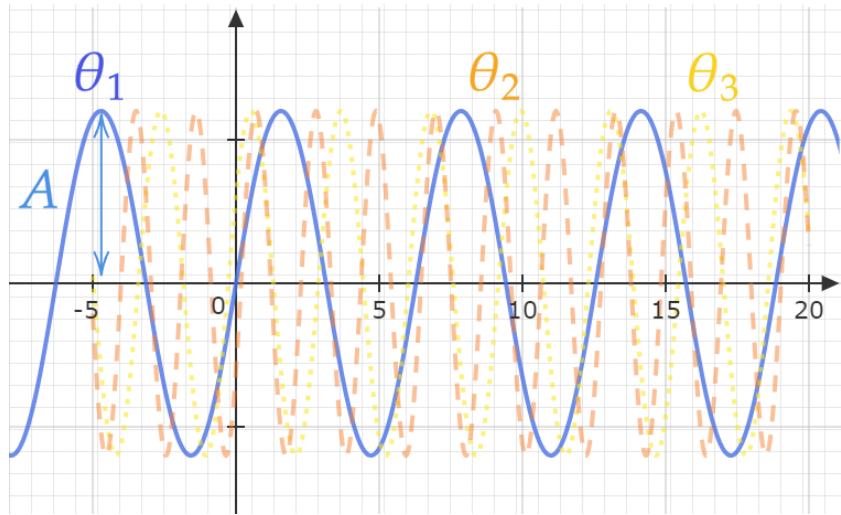


Figura 2.3: Fase y amplitud representadas gráficamente

El ojo humano reconoce solo diferencias en brillo y color, las imágenes que podemos ver están basadas en contrastes de estas dos propiedades. El brillo es una función de la amplitud de las ondas de luz. Si se tiene una muestra con un índice de refracción casi igual al del medio en el que se observa, esto dará lugar a un pequeño cambio del camino óptico entre la muestra y sus alrededores [12]. Como se puede apreciar en la Figura 2.4.

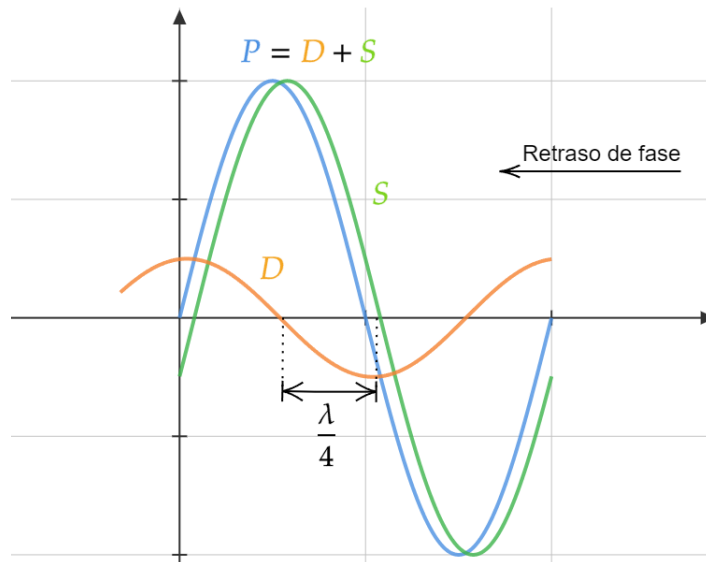


Figura 2.4: Retraso de una onda de luz producida por una partícula (P) de mayor índice de refracción que sus alrededores (S)

De este modo la onda P (que corresponde a la onda de luz que lleva información de la

partícula u objeto que se está observando) se retrasa ligeramente respecto a la onda D (correspondiente a la luz que hubiera pasado sin la muestra, solo a través del medio). Este pequeño desfase puede ser calculado como la diferencia de P menos S, obteniendo la onda D como resultado.

La onda D puede ser vista entonces como la onda de luz que es desviada (difractada) por el objeto, y contiene *únicamente* toda la información que puede poseer el mismo. Se considera que el desfase entre S y D, es pequeño cuando este es menor que $\frac{\lambda}{4}$, [12].

En el microscopio solo existe la onda P, la cuál es la suma de las ondas D y S, y describe la imagen final del espécimen u objeto, que será observado. Sin embargo hemos considerado una muestra transparente para esta técnica, por lo tanto notaremos que la diferencia de amplitud entre la onda P y la onda S es casi cero, es decir, no lograremos ver una diferencia de intensidades con suficiente contraste para apreciar el objeto, al menos en un microscopio convencional. Si bloqueáramos la onda de luz S de alguna manera, solo nos quedaríamos con la información que proporciona D, con muy baja intensidad, a la cuál denotaremos como iluminación de campo oscuro. En cambio si dejáramos pasar solo S, no tendríamos ningún detalle de la muestra, [12].

La microscopía de fase introduce un cambio de fase en la onda D respecto de S tal que estas se encuentren en la misma fase o bien a un $\frac{\lambda}{2}$ fuera de fase. De este modo se logra obtener un incremento llamativo en el contraste de amplitudes entre la muestra y el fondo, [12] Como se aprecia en las figuras 2.5a y 2.5b

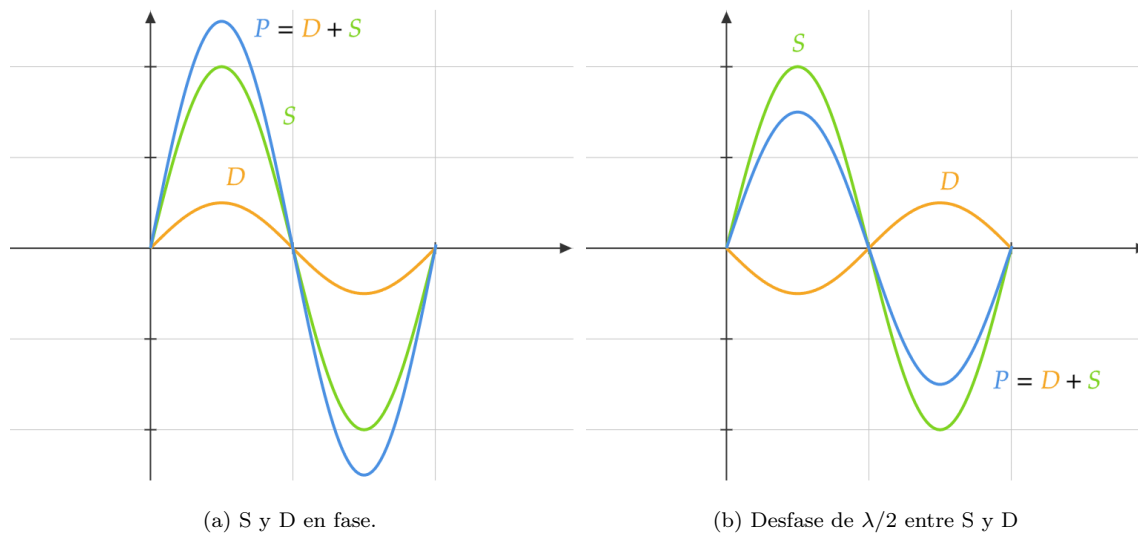


Figura 2.5: Mayor contraste de amplitudes a partir de diferencias de fase.

De esta manera observamos que la partícula se verá mucho más iluminada que su fondo. Análogamente podemos observar que si se retrasa la onda D, es ahora la luz de la partícula la que parece más oscura que el fondo. Es así como la microscopía de contraste de fase o de fase simplemente, es capaz de crear contrastes de amplitud a partir de introducir diferencias entre las fases de las ondas de luz del objeto.

La forma de lograr este retraso en la fase usualmente es mediante el uso de un material dieléctrico en el sistema óptico, este material introducirá un desfase en la onda de luz, ya sea la desviada o la que no es desviada. En la práctica se ocupa un instrumento conocido como “placa de difracción”

colocada cerca del punto focal posterior del objetivo de microscopio, centrado con el eje óptico del instrumento. El material se coloca al centro en un área pequeña, para solo afectar a la onda de luz no desviada, o la luz directa. Esta placa también tiene la capacidad de disminuir la amplitud de la onda S, absorbiendo parte de la energía, de una de las ondas para mejorar el contraste, gracias a un material absorbente, [12] Las ondas D y S se recombinarán para interferir en el plano focal del ocular, formando una imagen. La figura 2.6 representa el funcionamiento de un microscopio de fase de manera simplificada.

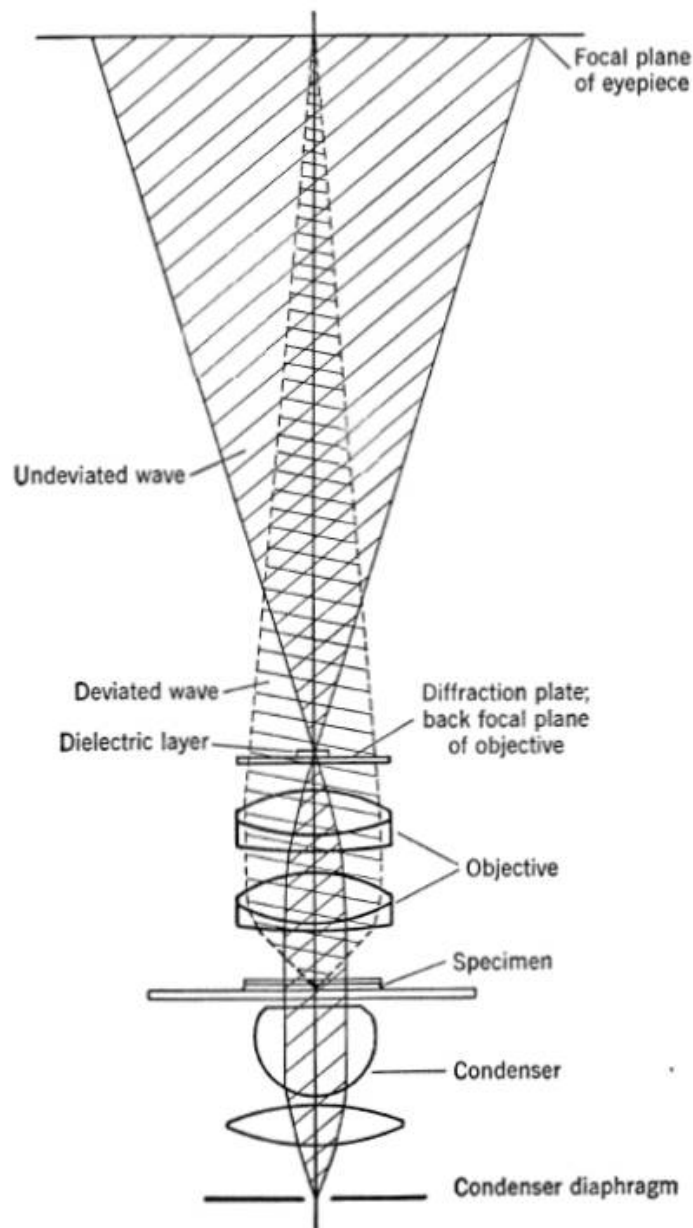


Figura 2.6: Diagrama del camino de la luz a través de un microscopio de fase [Diagrama tomado del libro *Introduction to phase microscopy*. Alva Bennet (1951) pp. 10]

Es importante recalcar al lector, que tanto el microscopio de fase, de contraste de fase o de

diferencias de fase hacen referencia al mismo concepto y aplicación de la teoría aquí explicada.

2.2. El problema de fase.

2.2.1. Fase óptica

Es común preguntarse qué es la fase, especialmente al principio de nuestros estudios sobre la óptica física. La fase como lo menciona Peter Hawkes et al. en su libro 'Handbook of Microscopy', es algo elusiva, es decir, difícil de alcanzar, capturar o comprender. Sin embargo, la óptica nos ofrece una manera relativamente sencilla de observar, capturar y comprender la fase de manera elegante y bella.

El problema de la recuperación de fase, la recuperación de una función dada la magnitud de su transformada de Fourier, surge en varios campos de la ciencia y la ingeniería, incluyendo la microscopía electrónica, la cristalografía, la astronomía y la imagen óptica. Explorar la recuperación de fase en entornos ópticos, específicamente cuando la luz se origina a partir de un láser, es natural, porque los dispositivos de detección óptica (por ejemplo, cámaras CCD, películas fotosensibles, el ojo humano) no pueden medir la fase de una onda de luz. Esto se debe a que, en general, los dispositivos de medición óptica que dependen de la conversión de fotones a electrones (corriente) no permiten la grabación directa de la fase. De hecho, los sistemas de medición/detección óptica miden el flujo de fotones, que es proporcional al cuadrado de la magnitud del campo, no a la fase. En consecuencia, medir la fase de las ondas ópticas (campos electromagnéticos que oscilan a 10^{15} Hz y superiores) implica una complejidad adicional, [1].

Afortunadamente los campos electromagnéticos tienen características que permiten recuperar la fase de estos de manera algorítmica. Esto se debe a la relación que existe entre su campo cercano y su campo lejano. El **campo lejano** (región en la cual la distribución espacial de luz está relacionada con las características de propagación de la onda) corresponde a la transformada de Fourier del **campo cercano** (región en la cual la distribución espacial de luz depende en su mayor parte de la forma geométrica de la fuente).

Más específicamente, dado un "máscara" que superpone alguna estructura (una imagen) sobre un campo coherente casi-monocromático en algún plano en el espacio, la estructura del campo electromagnético a una distancia suficientemente grande de ese plano está dada por la transformada de Fourier de la imagen multiplicada por un factor de fase cuadrático conocido. Así, medir el campo lejano, su magnitud y fase, facilitaría la recuperación de la imagen óptica (el campo de onda). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la fase óptica no puede ser medida directamente por un detector electrónico. Aquí es donde entra en juego la recuperación algorítmica de fase, ofreciendo un medio para recuperar la fase dada la medición de la magnitud del campo lejano óptico y algún conocimiento previo, [1].

La recuperación algorítmica de fase ofrece un medio alternativo para recuperar la estructura de fase de imágenes ópticas sin requerir configuraciones de medición sofisticadas como en la holografía.

En 1952, Sayre imaginó, en el contexto de la cristalografía, que la información de fase de una onda dispersa podría recuperarse si se midiera finamente el patrón de intensidad en y entre los picos de Bragg de la onda difractada. En cristalografía, la estructura del material en estudio es periódica (un cristal), por lo tanto, la información en el campo lejano contiene naturalmente picos fuertes que reflejan la transformada de Fourier de la información periódica. Medir las características finas en la transformada de Fourier permitió la recuperación de la fase en algunos casos simples.

Veintiséis años después, en 1978, Fienup desarrolló algoritmos para recuperar fases de imágenes 2D a partir de su módulo de Fourier y restricciones como no negatividad y un soporte conocido

de la imagen.

En los primeros años de la década de 1980, la idea de la recuperación de fase creó una oleada de trabajo de seguimiento, en parte porque esos tiempos significaban una gran esperanza para la realización de una computadora óptica, de la cual la recuperación de fase se suponía que era un ingrediente clave. Sin embargo, en las décadas de 1980 y 1990, con la comprensión de que una computadora óptica era irrealista, el interés en la recuperación algorítmica de fase disminuyó. Hacia el final del milenio, la recuperación de fase óptica comenzó a regresar a la investigación contemporánea en óptica, con el interés surgido de una dirección completamente diferente: la comunidad de investigadores experimentando con imagenología de rayos X, donde se desarrollaron nuevas fuentes de rayos X (unduladores y sincrotrones). El amplio interés en este campo fue generado principalmente por el primer registro experimental y la reconstrucción de un patrón de difracción continuo (magnitud de Fourier al cuadrado) de un objeto de prueba no cristalino (no periódico) por Miao y colaboradores en 1999, [13].

2.3. Difracción

La difracción es una consecuencia de que la luz sea un fenómeno ondulatorio. Cuando la luz interactúa con algún obstáculo, su frente de onda es modificado, alterando su fase y su amplitud, a este comportamiento se le conoce como **difracción**.

La difracción fue mencionada por primera vez en el trabajo de Francesco Grimaldi en el siglo XVII, fue el primer estudio detallado publicado sobre esta desviación de la luz de la propagación rectilínea, a la que llamó "*diffraetio*".

La definición de Sommerfeld para la difracción fue "cualquier desviación de los rayos de luz de trayectorias rectilíneas que no puede interpretarse como reflexión o refracción", [14].

Si en el transcurso de encontrar un obstáculo, ya sea transparente u opaco, una región del frente de onda se altera en amplitud o fase, se producirá la difracción. Los diversos segmentos del frente de onda que se propagan más allá del obstáculo interfieren, causando la particular distribución de densidad de energía conocida como patrón de difracción, [10]. La difracción es causada por la confinación de la extensión lateral de una onda, y es más apreciable cuando ese confinamiento es de tamaños comparables a una longitud de onda de la radiación utilizada, [15].

Surge la pregunta obvia, ¿Cómo podemos describir el frente de onda después de pasar por dicha abertura o borde? Matemáticamente es posible explicar la difracción a partir de las ecuaciones de Maxwell, este fue el análisis que realizó Kirchhoff en su Teoría de la difracción, sin embargo para el alcance de este trabajo se cree suficiente considerar solo una consecuencia de la mencionada teoría, que a la vez se trata de las ideas más brillantes y perspicaces del siglo XVII, el principio de Huygens, aunque perfeccionado por Fresnel años más tarde.

Matemáticamente es posible explicar la difracción gracias al principio de Huygens-Fresnel el cuál establece lo siguiente; **Cada punto sin obstrucción de un frente de onda, en un instante de tiempo determinado, sirve como fuente de trenes de onda esféricas secundarias de tal modo que, al cabo de cierto tiempo, el frente de onda será la envolvente de estos trenes de ondas. Además, si la onda se propaga tiene una frecuencia ν y se transmite por un medio a una velocidad v_t , entonces los trenes secundarios tendrán la misma frecuencia y velocidad. La amplitud del campo óptico en cualquier punto más allá es la superposición de todos estos trenes de onda (considerando sus amplitudes y fases relativas), ([10], [11])**

Difracción de Fraunhofer y Fresnel

Existen dos tipos de fenómenos que observamos en la difracción. Si nos encontramos a una distancia relativamente cerca a la abertura u obstrucción que genera la difracción, la distribución de intensidad (patrón de difracción) que observamos en una pantalla corresponderá a la difracción de Fresnel, también conocida como de campo cercano.

Por otra parte si observamos lo que pasa a una distancia relativa muy lejos del plano donde se origina la difracción, lo que se observa es un patrón de difracción diferente el cual está determinado por la difracción de Fraunhofer.

2.3.1. Difracción en un microscopio.

Después de pasar por un objeto transparente como por ejemplo, un portaobjetos y una muestra delgada, (utilizada en los microscopios de transmisión) los frentes de ondas modificados interfieren entre sí dando lugar a **patrones de difracción** y describen la distribución de densidad de la energía resultado de esta interacción.

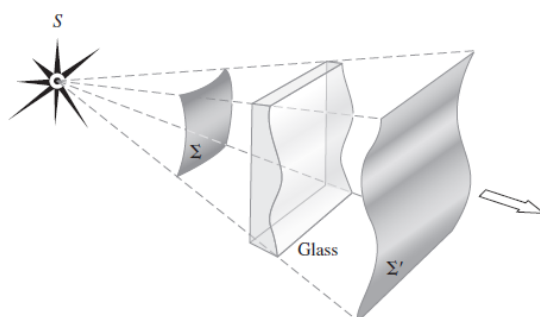


Figura 2.7: Distorsión de una parte del frente de onda al pasar a través de un material de espesor no uniforme. Tomado del Óptica Hecht, E. Capítulo 4, pp 107.

2.3.2. Interferencia

En la óptica, se conoce como **interferencia** al fenómeno que describe qué sucede cuándo varias ondas de luz, descritas por los campos vectoriales $\vec{E}_1, \vec{E}_2, \vec{E}_3 \dots$, concurren en un mismo punto del espacio. Gracias al principio de superposición, sabemos que el campo resultante es igual a la suma vectorial de los campos individuales involucrados, es decir se tiene que

$$\vec{E} = \vec{E}_1 + \vec{E}_2 + \dots \quad (2.9)$$

Sin embargo, el campo luminoso, \vec{E} por su velocidad de cambio en el tiempo (de 430 a 750 THz) es una cantidad poco práctica de detectar, en su lugar, para estudiar la interferencia, se ocupa la irradiancia I , para la cuál tenemos multiples sensores que nos permiten medirla directamente. La irradiancia es una medida de la concentración de la potencia y viene dada por

$$I = \epsilon \nu \langle \vec{E}^2 \rangle_T \quad (2.10)$$

donde ϵ es la permitividad eléctrica del medio, ν la frecuencia de la onda y $\langle \vec{E}^2 \rangle_T$ el promedio temporal de la magnitud de la intensidad de campo \vec{E} al cuadrado, es decir,

$$\vec{E}^2 = \vec{E} \cdot \vec{E} \quad (2.11)$$

donde ahora:

$$\vec{E}^2 = (\vec{E}_1 + \vec{E}_2) \cdot (\vec{E}_1 + \vec{E}_2) \quad (2.12)$$

según entonces:

$$\vec{E}^2 = \vec{E}_1^2 + \vec{E}_2^2 + 2\vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 \quad (2.13)$$

Si tomamos el promedio el tiempo de ambos lados, la irradiancia pasa a ser:

$$I = I_1 + I_2 + I_{12} \quad (2.14)$$

siempre que:

$$I_1 = \langle \vec{E}_1^2 \rangle_T \quad (2.15)$$

$$I_2 = \langle \vec{E}_2^2 \rangle_T \quad (2.16)$$

y

$$I_{12} = 2\langle \vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 \rangle_T \quad (2.17)$$

La última expresión se denomina término de interferencia. Para calcularlo en este caso en específico, formamos:

$$\vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 = \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} \cos(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} - \omega t + \epsilon_1) \cos(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} - \omega t + \epsilon_2) \quad (2.18)$$

o de una forma equivalente:

$$\begin{aligned} \vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 = \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} & [\cos(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} + \epsilon_1) \times \cos \omega t + \sin(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \epsilon_1) \sin \omega t] \\ & [\cos(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \epsilon_2) \cos \omega t + \sin(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \epsilon_2) \sin \omega t] \end{aligned} \quad (2.19)$$

Recordemos que el promedio temporal de una función $f(t)$, calculado en un intervalo T es:

$$\langle f(t) \rangle_T = \frac{1}{T} \int_t^{t+T} f(t') dt' \quad (2.20)$$

El periodo τ de las funciones armónicas es $2\pi/\omega$ y para nuestros propósitos presentes $T \gg \tau$. En ese caso el coeficiente $\frac{1}{T}$ frente a la integral tiene un efecto dominante. Después de multiplicar y calcular el promedio de la ecuación 2.19, obtendremos:

$$\langle \vec{E}_1 \cdot \vec{E}_2 \rangle_T = \frac{1}{2} \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} \cos(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} + \epsilon_1 - \vec{k}_2 \cdot \vec{r} - \epsilon_2) \quad (2.21)$$

donde se recurrió al hecho de que $\langle \cos^2 \omega t \rangle_T = \frac{1}{2}$, $\langle \sin^2 \omega t \rangle = \frac{1}{2}$ y $\langle \cos \omega t \sin \omega t \rangle_T = 0$. El término de indiferencia es por lo tanto:

$$I_{12} = \vec{E}_{01} \cdot \vec{E}_{02} \cos \delta \quad (2.22)$$

y δ , igual a $\vec{k}_1 \cdot \vec{r} - \vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \epsilon_2 - \epsilon_1$, es la *diferencia de fase* resultante de una diferencia de longitud de camino y una diferencia del ángulo de desfase inicial. Obsévese que si \vec{E}_{01} y \vec{E}_{02} (y por consiguiente, \vec{E}_1 y \vec{E}_2) son perpendiculares, $I_{12} = 0$ e $I = I_1 + I_2$. Estos estados ortogonales \mathcal{P} se combinarán para dar un estado \mathcal{R} , \mathcal{L} , \mathcal{P} , o \mathcal{L} pero la distribución de densidad de flujo quedará inalterada. La situación más corriente en el trabajo que sigue, corresponde a \vec{E}_{01} paralela a \vec{E}_{02} . En este caso, la irradiancia se reduce al valor calculado en el análisis escalar. En estas condiciones:

$$I_{12} = E_{01} E_{02} \cos \delta \quad (2.23)$$

lo cual puede escribirse mas oportunamente se se observa que:

$$I_1 = \langle \vec{E}_{01}^2 \rangle_T = \frac{E_{01}^2}{2} \quad (2.24)$$

e

$$I_1 = \langle \vec{E}_1^2 \rangle_T = \frac{E_{01}^2}{2} \quad (2.25)$$

El termino de interferencia queda:

$$I_{12} = 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \delta \quad (2.26)$$

donde la irradiancia total es:

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \delta \quad (2.27)$$

En varios puntos del espacio, la irradiancia resultante puede ser mayor, menor o igual a $I_1 + I_2$ según en valor de I_{12} , es decir, de δ . Un máximo en la irradiancia se obtiene cuando $\cos \delta = 1$, de modo que:

$$I_{max} = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \quad (2.28)$$

$$\delta = 0, \pm 2\pi, \pm 4\pi, \dots \quad (2.29)$$

En este caso de **interferencia constructiva total**, el desfase entre las dos ondas es un múltiplo entero de 2π mientras que las perturbaciones están en fase. Cuando $0 < \cos \delta < 1$, las ondas están desfasadas, $I_1 + I_2 < I < I_{max}$ y el resultado se denomina interferencia constructiva. Con $\delta = \pi/2$, $\cos \delta = 0$, las perturbaciones ópticas están desfasadas, $\frac{\pi}{2}$ e $I = I_1 + I_2$. Para $0 > \cos \delta > -1$ disponemos de las condiciones de de interferencia destructiva, $I_1 + I_2 > I > I_{min}$. Una irradiancia mínima se produce cuando las ondas están desfasadas π radianes, los valles se superponen a las crestas, $\cos \delta = -1$:

$$I_{min} = I_1 + I_2 - 2\sqrt{I_1 I_2} \quad (2.30)$$

Esto se produce cuando $\delta = \pi, \pm 3\pi, \pm 5\pi, \dots$ y se denomina **interferencia destructiva total**, [16].

2.4. La Transformada de Fourier.

Las imágenes pueden ser comprendidas como señales dependientes de dos variables espaciales en el plano XY, donde x y y , son las variables independientes de las funciones que describan dichas señales. De forma análoga a las señales eléctricas o informáticas, y sus respectivos sistemas, podemos analizar las señales y los sistemas de imágenes con el análisis de Fourier, de este modo se realiza un análisis de la señal desde una perspectiva de sus frecuencias. Es importante recordar que la señales dependientes del tiempo suelen tener asociado un periodo, y que el inverso de este periodo está definido como la frecuencia temporal de la función. Así también podremos definir la **frecuencia espacial** de una función asociada a una imagen (señal luminosa).

2.4.1. Frecuencias espaciales

En algunos sistemas físicos el análisis de la información de variación de las señales del sistema en el tiempo y el espacio son de particular interés. Para el caso que nos concierne en este trabajo, dicha señal es la luz visible. La transformada de Fourier es una herramienta matemática que nos permite realizar el análisis mencionado. En la óptica, nos ocuparemos mayoritariamente de la información difundida en una región del espacio en un punto temporal fijo, [17].

Existe una función $I(y, z)$ que asigna un valor correspondiente a la irradiancia, a cada punto en la imagen, como se muestra en la figura 2.8

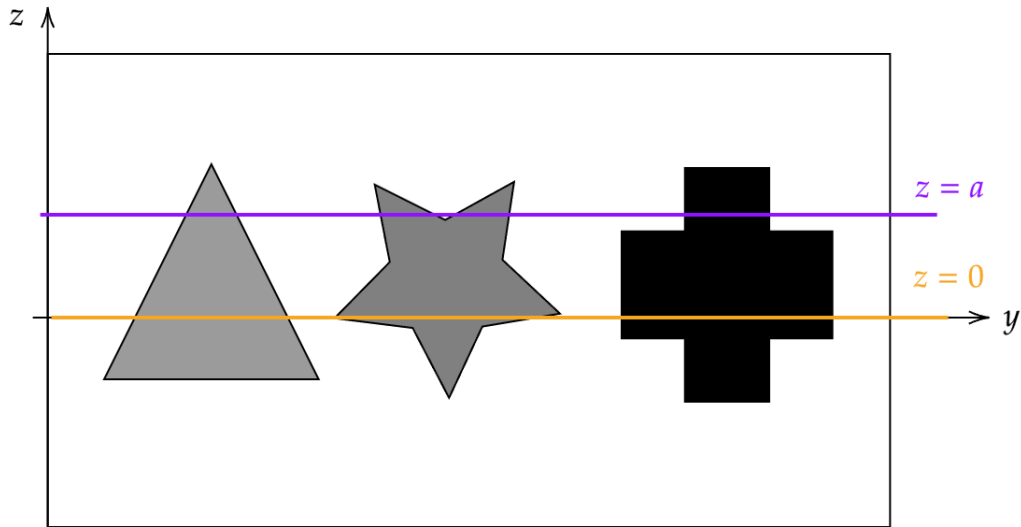
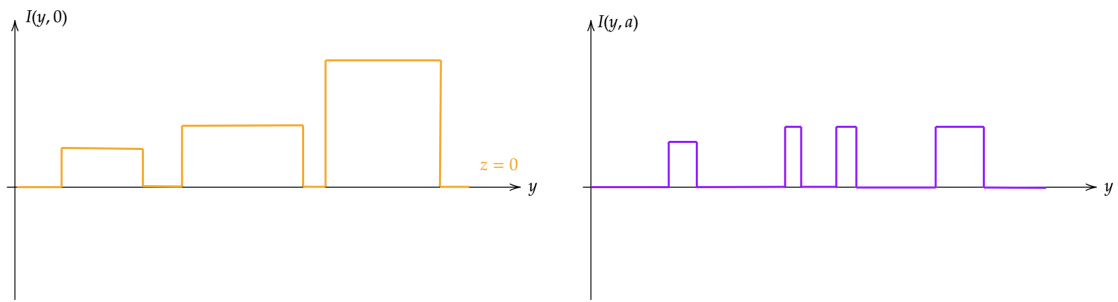


Figura 2.8: Distribución bidimensional de irradiancia.

Si se barre la imagen con una línea horizontal $z=0$, y se representa gráficamente (Figura 2.9a) las variaciones de la irradiancia con la distancia punto por punto se obtiene un gráfico que expresa la frecuencia de las irradiancias en la imagen respecto a su posición en y .



(a) Barrido en $z=0$

(b) Barrido en $z=a$

Esta información puede sintetizarse a partir de funciones armónicas con ayuda de las técnicas del análisis de Fourier. Es posible transformar la información asociada con cualquier línea de barrido en una serie de funciones sinusoidales de amplitud y frecuencia espacial apropiadas.

Para describir cualquier función como $I(y,0)$ ó $I(y,a)$, de manera general, una función $f(x)$, podemos recurrir a una serie de Fourier, o de manera aún más general trabajar con **la integral de Fourier**, la cuál se define a continuación, [18].

$$f(x) = \frac{1}{\pi} \left[\int_0^{\infty} A(k) \cos kx \, dk + \int_0^{\infty} B(k) \sin kx \, dk \right] \quad (2.31)$$

donde $A(k)$ y $B(k)$ son las transformadas seno y coseno de Fourier, y están descritas como

$$A(k) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x') \cos kx' \, dx' \quad (2.32)$$

$$B(k) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x') \sin kx' dx' \quad (2.33)$$

Sustituyendo las ecuaciones 2.32 y 2.33 en la ecuación 2.31. Utilizando el teorema de Euler es posible pasar a una sola expresión exponencial compleja,

$$f(x) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \left[\int_{-\infty}^{\infty} f(x') e^{ikx'} dx' \right] e^{-ikx} dx \quad (2.34)$$

Esta ecuación será de utilidad para definir la transformada de Fourier a continuación.

2.4.2. Transformada de Fourier

La transformada de Fourier es una herramienta matemática que nos permite analizar cualquier señal que pueda expresarse como una función dependiente del espacio o del tiempo. Para este trabajo, la variable independiente de interés de dicha función es el espacio, $f(x)$, como ya se introdujo en la sección anterior.

La transformada de Fourier se puede expresar como;

$$F(k) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{ikx} dx \quad (2.35)$$

de tal modo que $F(k)$ es la transformada de Fourier de $f(x)$ y se denota simbólicamente por

$$\mathcal{F}\{f(x)\} = F(k) \quad (2.36)$$

Dado que $\mathcal{F}\{f(x)\}$ es una cantidad compleja será posible expresarla en términos de su amplitud de valor real, $|F(k)|$, denominado el espectro de amplitud, y una fase de valor real $\phi(k)$, el espectro de fase.

$$F(k) = |F(k)| e^{i\phi(k)} \quad (2.37)$$

Es casi intuitivo, el observar que si $F(k)$ es la transformada de Fourier de $f(x)$, entonces $f(x)$ será la función inversa, es decir la **Transformada inversa de Fourier** de $F(k)$,

$$f(x) = \mathcal{F}^{-1}\{F(k)\} = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{f(x)\}\} \quad (2.38)$$

En sí el trabajo de la transformada de Fourier es llevarnos del dominio espacial al dominio frecuencial, por ello $F(k)$ es dependiente de la variable k , la frecuencia angular de la señal.

2.4.3. Transformada de Fourier en 2 dimensiones

La transformada de Fourier en dos dimensiones es muy similar a su análoga unidimensional. Y en realidad es la función que se ocupa para el análisis de imágenes, ya que estas son al final señales bidimensionales.

Las transformadas de Fourier e inversa de Fourier son extendidas a dos dimensiones como,

$$F(k_x, k_y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{i(k_x x + k_y y)} dx dy \quad (2.39)$$

y

$$f(x, y) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(k_x, k_y) e^{-i(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (2.40)$$

Del mismo modo que en la transformada de Fourier unidimensional, las variables k_x y k_y representan las frecuencias espaciales angulares a lo largo de los dos ejes.

2.5. Imágenes computacionales

La observación de objetos ya sea muy grandes, o muy pequeños (lo que concierne a este trabajo), ha sido de gran interés a lo largo de la historia de la humanidad, este reto nos llevo a la construcción de artefactos como el telescopio y el microscopio. Sin embargo con la existencia de estos, aún existía un reto a superar, el obtener imágenes de buena calidad y fidedignas de los objetos bajo observación. Durante muchos años, la solución a este reto fue fabricar una o más lentes con la mayor precisión posible y disponerlas de la manera más precisa posible en un instrumento, [4].

Con la llegada de las computadoras, se creó una nueva forma de resolver el problema; si la imagen presentaba defectos (artefactos o aberraciones) derivadas del hardware físico utilizado en el instrumento, las ópticas variables en el software pueden ser ajustadas para mejorar la imagen mediante un cálculo de retroalimentación.

Un salto conceptual más radical es darse cuenta de que quizás no deberíamos preocuparnos por nuestra imagen en absoluto. Todo lo que necesitamos es un detector situado en algún lugar de un sistema óptico que registre algo rico en información ya sea una imagen o no. Ahora lo que necesitamos son elementos ópticos que codifiquen información sobre nuestro objeto de la manera más eficiente posible antes de que llegue al detector. Una vez que tengamos estos datos, podemos decodificarlos (asumiendo que sabemos algo sobre los elementos ópticos de codificación) y generar computacionalmente nuestra imagen. Este paradigma de imagen hoy en día se llama ampliamente **imagen computacional** 2.9. Un canal de comunicación reemplaza la función de transferencia óptica de la lente tradicional: la información estructural se transfiere a través de tres pasos: cifrado físico; detección; y finalmente un algoritmo de decodificación, [4].

La pticografía de Fourier, es en efecto, un método de imagen computacional, puesto que consiste en un detector, el cual mide información codificada por un elemento óptico (un objetivo de microscopio, por ejemplo), y decodifica la información computacionalmente, a través de un algoritmo para dar lugar a la imagen final. La técnica se describe con lujo de detalle en la sección 2.7.

Detectores

Por lo mencionado anteriormente, un elemento imprescindible para las imágenes computacionales es el detector con el que se adquiere la información; para este trabajo en particular, la información está en las imágenes de la muestra. Existen dos tipos de detectores utilizados en las cámaras digitales (aunque no los únicos), ampliamente conocidos y empleados en la investigación científica; El detector de Dispositivo de Carga Acoplada (Charge-Coupled Device, CCD) y el detector de Semiconductor Complementario de Óxido Metálico (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor, CMOS por sus siglas en inglés), para la implementación del prototipo se han empleado cámaras tipo CMOS, por lo que se considera conveniente explicar brevemente, cómo funcionan dichos dispositivos.

El detector CMOS se basa en el efecto fotoeléctrico. Está formado por numerosos fotositos (fotodiodo; un semiconductor con unión PN), uno para cada píxel, que producen una corriente eléctrica que varía en función de la intensidad de luz recibida. En el CMOS, a diferencia del CCD se incorpora un amplificador de la señal eléctrica en cada fotosito y es común incluir el conversor digital en el propio chip. La ventaja sobre el detector CCD, es que la electrónica puede leer directamente la señal de cada píxel, [20]. Los sensores CMOS son generalmente más eficientes en términos de energía y pueden integrarse con otros circuitos en el mismo chip, lo que los hace más económicos y rápidos para ciertas aplicaciones.

Estos detectores tienen la tarea de convertir la señal analógica (la imagen producida por el objetivo) en una señal digital (una imagen digital). Este proceso implica naturalmente que

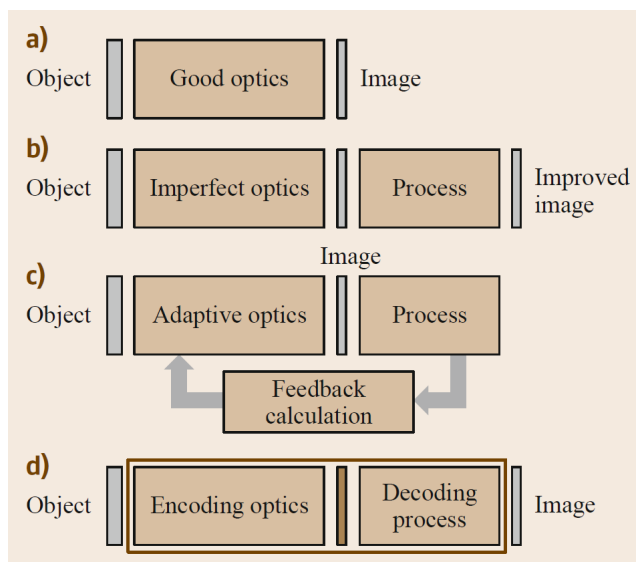


Figura 2.9: **Paradigma de la imagen computacional.** a) Un microscopio convencional. b) Los errores en los elementos ópticos se corrigen en el post procesamiento. c) Los errores en las ópticas se miden en un plano detector. Luego, las ópticas variables se ajustan para mejorar la imagen mediante un cálculo de retroalimentación. d) Pticografía. [Diagrama tomado del libro Springer handbook of microscopy. Holography, Ptychography and Diffraction. John Rodenburg (2019) pp. 820]

se discretizará la función de la señal que se quiere adquirir, dado que es físicamente imposible capturar infinitos puntos de la señal. Con esta restricción de por medio surge el teorema de Nyquist.

2.5.1. Teorema de Nyquist.

La discretización de la señal se hace a través del **muestreo**; esto significa que se toma una muestra a intervalos regulares de tiempo (o espacio). Este paso reduce el dominio continuo del tiempo (o espacio) a una secuencia de intervalos discretos.

El inverso del intervalo de muestreo es la frecuencia de muestreo: el número de muestras en un segundo u otra unidad, para el caso de la imágenes está unidad será el paso del píxel (en inglés *pitch pixel*) del detector.

El teorema de Nyquist-Shannon, también conocido como el teorema de muestreo, establece que la frecuencia de muestreo f_s , puede representar una señal lo más fidedigna posible a la señal analógica siempre y cuando esta sea mayor que el doble de la frecuencia más alta de la señal f_{max} . Por ejemplo; si una señal tiene una frecuencia máxima de 500 Hz, una tasa de muestreo suficiente es cualquier tasa mayor a 1000 Hz.

El teorema de Nyquist-Shanon, es relevante debido a que implica ciertas condiciones que se deben considerar en el espacio de frecuencias en el algoritmo de PF. Para más información relacionada con este teorema se invita ampliamente al lector interesado a visitar la referencia, [21].

2.6. HDR

En el contexto de las imágenes digitales, el concepto de HDR (High Dynamic Range por sus siglas en inglés) hace referencia al conjunto de tecnologías y técnicas de imagen que permiten aumentar el rango dinámico o el rango de valores que cada píxel puede representar en una imagen

digital.

Actualmente, la gran mayoría de las imágenes en color se representan con un byte por píxel para cada uno de los canales rojo, verde y azul. Con tres bytes por píxel, se pueden asignar más de 1.6 millones de colores diferentes a cada píxel. Pese a que puede parecer un número impresionantemente grande al principio, debe tenerse en cuenta que solo hay 256 valores para cada uno de los componentes rojo, verde y azul de cada píxel, [22]. Tener solo 256 valores por canal de color es inadecuado para representar muchas escenas, por ejemplo; la configuración general de una escena interior con una ventana es bastante común. Esto lleva a tener áreas tanto brillantes como oscuras en la misma escena, como se ilustra en la figura 2.10

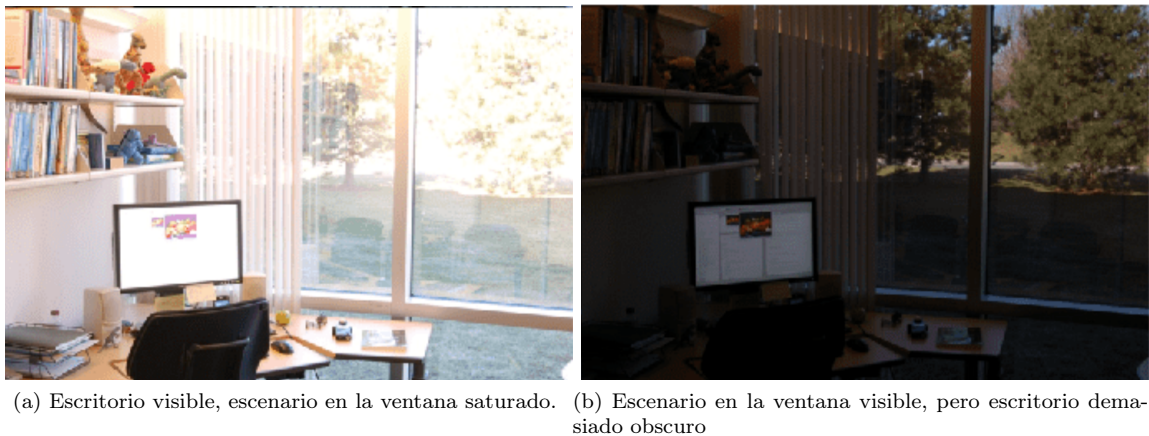


Figura 2.10: Configuración general de una escena interior con una ventana.

De tal suerte que, lograr capturar una imagen de este estilo, es prácticamente imposible a un solo tiempo de exposición. Son necesarios más valores, para poder representar la escena correctamente.

Aunque existen diferentes maneras de adquirir imágenes de HDR, en esta sección se detalla solo el método que se ha utilizado; HDR a partir de múltiples tiempos de exposición.

Para crear una imagen HDR, se toman múltiples exposiciones de la misma escena, cada una capturando diferentes partes de la escena con diferentes niveles de exposición, Figura 2.11, luego cada imagen en la secuencia tendrá píxeles correctamente expuestos en alguna parte, mientras que otros píxeles estarán subexpuestos o sobreexpuestos, consecuentemente se ignoran los píxeles demasiado oscuros y demasiado brillantes y las imágenes se normalizan dividiendo cada píxel por el tiempo de exposición, recuperando así los valores de irradiancia. Finalmente los píxeles correspondientes se promedian a lo largo de las exposiciones para crear una imagen HDR, [22]. La imagen HDR obtenida para este proceso se muestra en la figura 2.12

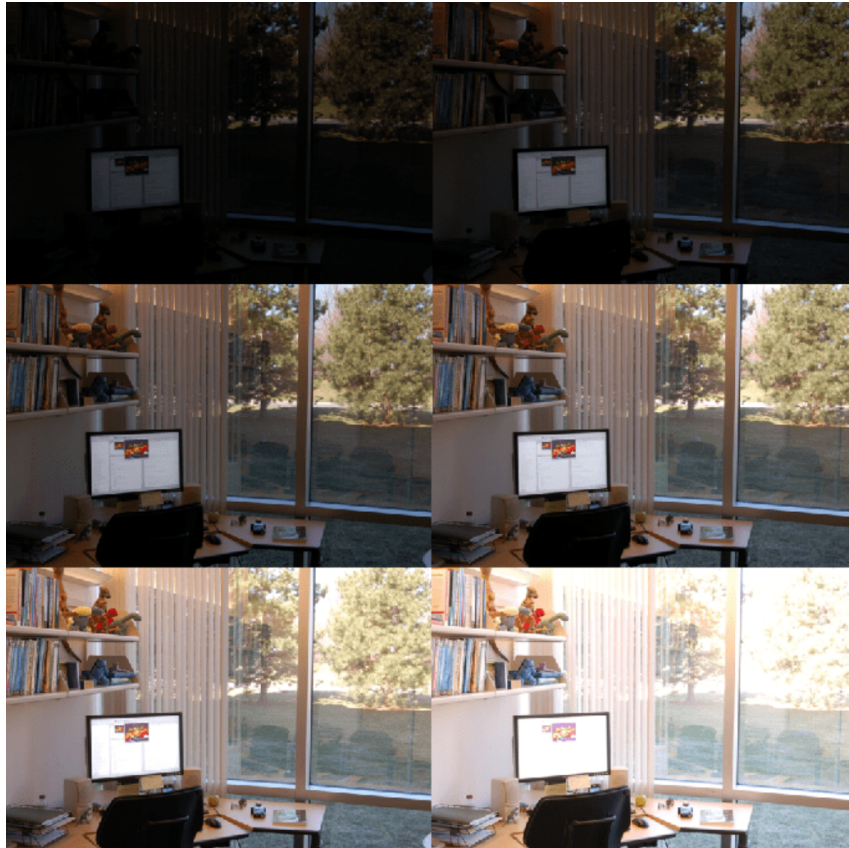


Figura 2.11: Seis imágenes de la misma escena capturadas con diferentes tiempos de exposición. Imágenes tomadas de la documentación de Matlab. Ver `make_hdr`.



Figura 2.12: Imagen HDR obtenida.

2.7. Pticografía de Fourier

Como se ha mencionado al inicio de este texto la pticografía surge en el contexto de resolver el problema de fase para muestras periódicas; en específico en el estudio de la cristalografía donde fue empleada principalmente para longitudes de onda de rayos X, ([8],[1]). La pticografía (así, solita, sin el carcaterístico "de Fourier") es una técnica de imagen computacional. Donde un detector

registra un extenso conjunto de datos que consiste en muchos patrones de difracción obtenidos cuando un objeto se desplaza a varias posiciones en relación con un campo de iluminación, o bien la fuente de iluminación se desplaza en relación al objeto, y posteriormente utiliza algún tipo de algoritmo informático para invertir estos datos en una imagen [4].

La pticografía no depende de una lente de buena calidad incluso puede no utilizar lente en absoluto; puede obtener la onda de imagen en fase así como en intensidad; y puede auto-calibrarse en el sentido de que los errores que surgen en el montaje experimental pueden ser tenidos en cuenta y sus efectos eliminados. Aunque los conceptos principales de la pticografía se desarrollaron hace muchos años, solo recientemente (en los últimos 10 años) ha sido ampliamente adoptada, [4].

La pticografía de Fourier emplea un algoritmo específico que utiliza las funciones transformada de Fourier y transformada de Fourier inversa para obtener la imagen deseada, de ahí su nombre. La PF aplicada a la microscopía nos brinda tres importantes ventajas frente a la microscopía óptica convencional;

- Nos permite realizar un análisis tridimensional de la superficie del objeto observado. Gracias a que el algoritmo computacional utilizado nos da la información de fase de la onda.
- Es capaz de aumentar la abertura numérica del objetivo empleado, de manera sintética (es decir, de manera computacional), debido al plegado de los múltiples patrones de difracción en el espacio de frecuencias. Aumentar la NA trae como consecuencia mejorar la resolución de la imagen, como se ha detallado en la sección 2.1.6
- Pese a que la NA es modificada de manera sintética, se conserva campo de visión utilizado. Esta ventaja adquiere relevancia cuando se utiliza un objetivo de bajas NA los cuáles están asociados a amplios campos de visión. De esta manera logramos una combinación difícil de alcanzar en la microscopía en general, un amplio campo de visión y una gran NA (una muy alta resolución).

Esta nueva abertura numérica sintética, se puede calcular como

$$NA_{syn} = NA_{obj} + NA_{illu} \quad (2.41)$$

donde NA_{obj} es la abertura numérica del objetivo y NA_{illu} es la abertura numérica generada a través de la superposición de las diferentes funciones de transferencia obtenidas de la iluminación oblicua, y esta definido como

$$NA_{illu} = \frac{k_{max}}{2\pi\lambda} \quad (2.42)$$

La pticografía de fourier es una técnica de microscopía computacional muy novedosa, capaz de extender las capacidades de un microscopio más allá de las limitaciones físicas de su óptica a través de la computación, [3].

Advertimos que esta abertura numérica del sistema no se puede comparar directamente con la abertura numérica nativa de una lente objetivo de microscopio convencional. Para calcular la resolución en ambos escenarios, las condiciones de iluminación y si el proceso de medición es coherente o incoherente son factores adicionales que deben considerarse, [27].

Algoritmo iterativo autoconvergente PF.

El proceso de recuperación del algoritmo de PF, sigue la estrategia de la técnica de recuperación de fase: busca una estimación de muestra de alta resolución que sea consistente con N mediciones de baja resolución, para nuestro caso (49 y 9 imágenes según la matriz empleada). El algoritmo

alterna entre los dominios espacial y frecuencial (o de Fourier) de la estimación de la muestra, [3].

En el dominio espacial, las mediciones de intensidad de baja resolución se utilizan como restricciones del objeto para garantizar la convergencia de la solución. En el dominio de Fourier, se impone la función de transferencia coherente del objetivo como restricción de soporte, [5]. El proceso de recuperación de FP se resume en la Figura 2.13.

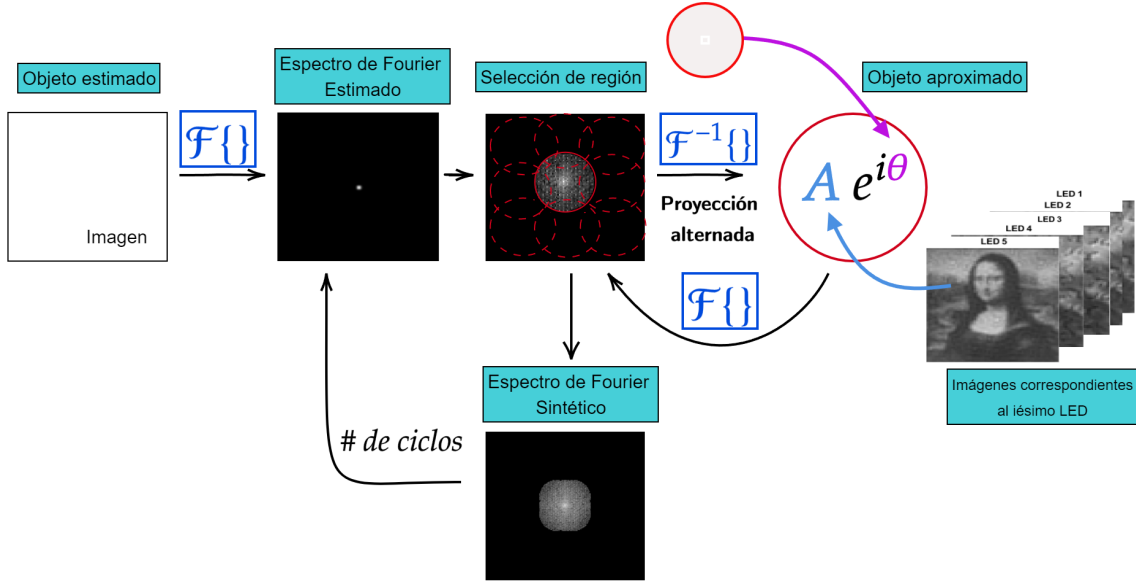


Figura 2.13: Diagrama simplificado de cómo funciona el algoritmo de Pticografía de Fourier.

1. El algoritmo parte de realizar una suposición inicial en el dominio espacial de la imagen de alta resolución, $I_{hr}e^{i\varphi_{hr}}$, donde se considera $\varphi_{hr} = 0$ e I_{hr} una matriz de unos o una imagen interpolada de las imágenes de baja resolución medidas. Representada en el esquema como el objeto estimado. El subíndice hr hace referencia a las variables de la imagen de alta resolución o *high resolution*, en inglés.

A partir de este se calcula su espectro de Fourier, a través de aplicar al objeto estimado la transformada de Fourier. Es decir, pasamos del dominio espacial al dominio frecuencial del objeto estimado.

2. En el espacio de Fourier, se genera la sección correspondiente a una de las imágenes de baja resolución medidas, y tiene la forma matemática $\sqrt{I_l}e^{i\varphi_l}$, donde el subíndice l hace referencia al LED que le da origen. En el diagrama se ilustra con una circunferencia roja continua para la imagen correspondiente al LED central.

A la sección escogida se le aplica ahora la transformada inversa de Fourier, lo que nos devuelve al dominio espacial, y da como resultado un objeto aproximado.

3. Este nuevo objeto aproximado es obligado a tomar la forma de la imagen de baja resolución correspondiente a su sección, a través de remplazar I_l por por la intensidad medida denotada por I_{lm} , (es decir la l -ésima imagen de baja resolución)

$$\sqrt{I_l}e^{i\varphi_l} \rightarrow \sqrt{I_{lm}}e^{i\varphi_l} \quad (2.43)$$

Posteriormente se realiza la transformada de Fourier al objeto aproximado para ser actualizado en el espacio de Fourier de la imagen de alta resolución.

4. El paso 2 y 3 se repetirán para todas las ondas planas incidentes, o equivalentemente para el total de N imágenes de intensidad medidas. En la literatura a este proceso se le conoce como **proyección alternada**, [4].
5. Una vez realizado el proceso de proyección alternada, para cada uno de los LEDs se obtiene una solución convergente en el espacio de Fourier o también denominado Espectro sintético de Fourier, y corresponde al espacio de frecuencias de la imagen de alta resolución recuperada, que es empleado como el nuevo espectro de Fourier. Se repiten los pasos del 2 al 4 hasta la convergencia, de ahí el nombre largo del algoritmo. En la literatura el número de ciclos depende en mayor medida de los componentes empleados para obtener imágenes de baja resolución de buena calidad, y el número de ciclos puede oscilar entre 5 y hasta 1000 ciclos para asegurar la convergencia, ([5], [19]).

Una vez se cumple el número de ciclos requerido, el espectro sintético de Fourier se transforma de nuevo al dominio espacial para recuperar un campo de alta resolución, dado como;

$$\sqrt{I_h} e^{i\varphi_h} \tag{2.44}$$

del cual es posible extraer mediante operaciones sencillas su amplitud y su fase. Cuando estos datos son graficados se obtienen entonces las imágenes de alta resolución de amplitud y fase.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Prototipo experimental

Para la implementación de la técnica de PF en un prototipo de microscopio, se necesitó establecer los materiales que conformarían y caracterizar los parámetros físicos del instrumento, es decir las distancias entre elementos ópticos para una correcta visualización de las imágenes observadas, así como caracterizar todas las medidas de sus piezas mecánicas para que conformen un dispositivo lo suficientemente robusto. Los elementos ópticos y el diseño mecánico del prototipo se describen con detalle en este capítulo.

3.1.1. Sistema de iluminación

Un punto fundamental en la técnica de PF es el sistema de iluminación utilizado. En un microscopio óptico convencional el sistema de iluminación es incoherente (iluminación Kohler). El funcionamiento del microscopio pticográfico se fundamenta en la linealidad que existe en un sistema de imágenes coherentes, es decir imágenes que han sido obtenidas mediante iluminación coherente o parcialmente coherente. Este tipo de iluminación se encuentra de manera accesible en la luz proporcionada por LEDs. Ya que en la técnica de PF se necesita iluminar la muestra desde distintos ángulos se propone el uso de una matriz de LEDs comercial, con una distancia centro a centro del LED (“LED gap” en inglés) dados, que nos permita realizar la iluminación con dichos ángulos de incidencia.

Se trabajó con dos tipos de fuentes de iluminación; una matriz de LEDs de 8x8 elementos y otra matriz de 64x64 elementos, alimentadas con 5V por una fuente de voltaje. Para ambas se realizaron sus respectivas programaciones en arduino y posteriormente la programación de sus funciones de encendido LEDs. La programación en arduino establece la comunicación entre la fuente de luz y la computadora.

Como se ha explicado en el capítulo 2.7, la adquisición de las imágenes a través del detector, debe hacerse en un orden específico, ya que está será la manera de almacenar las imágenes en la computadora, y que posteriormente utilizaremos para alimentar el algoritmo de PF. Por esta razón es de suma importancia establecer una secuencia de encendido de LEDs ordenada, ya que de otro modo, podría existir confusión en la imagen capturada y el LED correspondiente a dicha imagen. De no tener cuidado en este paso, es posible alimentar erróneamente el algoritmo y no se podrán recuperar las imágenes de amplitud y fase.

A continuación se describen las características más importantes de cada matriz, tales como la longitud de onda a la que emiten sus LEDs, la separación entre LEDs, y su nivel de intensidad alcanzado. La importancia de conocer estos datos radica en programar correctamente los parámetros físicos en el apartado computacional.

Matriz WS2812

La primera fuente de iluminación es una matriz LED modelo WS2812 RGB que consta de 8x8 elementos, los cuáles se encuentran separados una distancia de 8 mm.

Se caracterizó a través de un fotodetector, la longitud de onda principal emitida por cada uno de los LEDs, rojo, verde y azul, a través de los cuáles se obtuvieron los siguientes datos para cada color;

$\lambda(nm)$	Rojo	Verde	Azul
$\Delta\lambda$	602.57 - 648.64	500.5 - 556.19	440.49 - 502.8
λ_{max}	465.81	522.46	632.90

Tabla 3.1: Longitud de onda para cada color de LED Matriz 8x8

La matriz 8x8 provee de 255 niveles de intensidad en los tres colores de LED, con un consumo de hasta 1.5 A. Los LEDs están denotados del 0 al 64, comenzando de la esquina superior izquierda hasta la esquina inferior derecha, tomando como referencia la esquina que posee las conexiones al arduino y la fuente de alimentación cómo la esquina superior izquierda. El LED central según este sistema de referencia es el LED 27.

Matriz Adafruit 64x64

La segunda fuente de iluminación fue una matriz marca Adafruit de 64x64 LEDs con una separación entre ellos de 3 mm. La caracterización de los LEDs dio las siguientes longitudes de onda para cada color,

Rojo	Verde	Azul
632 nm	531 nm	430 nm

Tabla 3.2: Longitud de onda para cada color de LED Matriz 64x64

Esta fuente de iluminación cuenta con 7 niveles de intensidad para cada uno de los LEDs rojo, verde y azul. Con un consumo de hasta 1 A en su intensidad más alta, para el encendido de cada LED. Las posiciones de los LEDs se denotan en el programa como coordenadas donde el LED central está dado como la coordenada (31, 31).

Es importante señalar en este punto la diferencia en las capacidades de intensidad para cada matriz, que será una característica poco favorable para la matriz de 64x64 en el momento de la implementación.

3.1.2. Muestras delgadas

Ya que el microscopio diseñado es un microscopio de transmisión, las muestras delgadas tienen, como objetivo fundamental, permitir el paso de luz suficiente para ser difractada y capturada por el detector.

Las muestras deben tener como máximo un grosor de 30 μm , para poder ser utilizadas correctamente en el algoritmo, como se menciona en la sección 2.7. En este rango de grosor la recuperación de fase tiene un error aceptable, [4]. Se consideran dos tipos de muestras generales para caracterizar el microscopio pticográfico; Patrones de resolución y muestras biológicas, a continuación, detallamos las características de cada una de ellas.

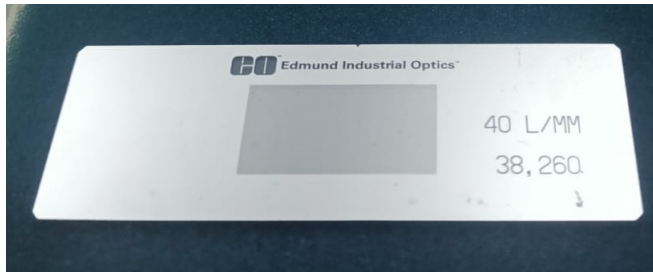


Figura 3.2: Rejilla ronchi 40 líneas por mm

3.1.3. Patrones de resolución

Reticula II E-13B

Se ocupó el patrón de resolución de frecuencia variable el cuál es una retícula de la marca Edmund Optics. Se observaron dos regiones de esta muestra. La región de cuadritos de 0.008" de lado (señalada en rojo), y la región de las letras "RETICLE" (región señalada en azul). La retícula se muestra en la figura 3.1

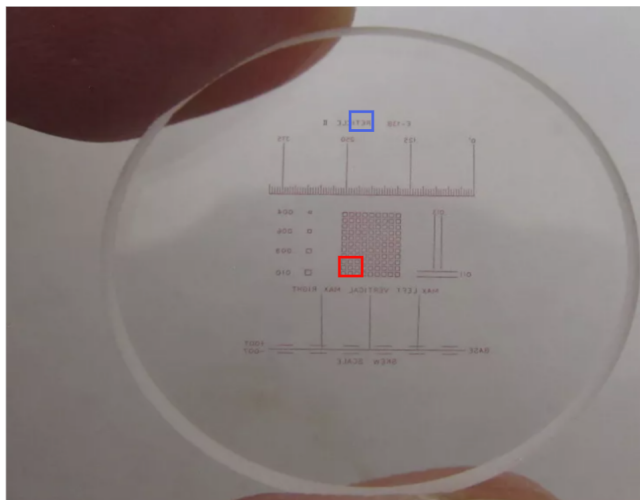


Figura 3.1: Reticula II E-13B

Rejilla de Ronchi 40 L/mm

Como segundo patrón de resolución fue utilizada una rejilla de Ronchi (Figura 3.2) de la marca Edmund Optics modelo #38 – 260, de 1" × 3" de tamaño, y con un patrón de 12.7 × 25.4 mm, con un recubrimiento de cromo depositado al vacío, [23].

3.1.4. Objetivo de microscopio

Se ocuparon dos tipos de objetivos, ambos de la marca Nikon, se describen sus detalles según el modelo utilizado.

Objetivo MSB50040

Como ya se vió en el apartado 2.1.1 la amplificación nos indica cuántas veces aumentamos el tamaño del objeto. Para el primer objetivo se tiene una amplificación de 4X, tiene una abertura numérica de 0.1 y su capacidad de resolución, dada la ecuación 2.7 para una longitud de onda de 632 nm es,

$$d = \frac{0.61\lambda}{NA} = \frac{0.61(632\text{ nm})}{(0.1)} = 3.85\ \mu\text{m} \quad (3.1)$$

Además tiene una distancia de trabajo (WD) de 25 mm y un campo de visión de 4.5 mm , [24].

Objetivo MSB50100

Se trabajó también con un objetivo de amplificación 10X, el cual tiene una abertura numérica de 0.25 y su capacidad de resolución para el mismo tipo de longitud de onda es de $1.54\ \mu\text{m}$. Se tiene una distancia de trabajo de $5.6\ \mu\text{m}$ y un campo de visión de 1.80 mm , [25].

Los objetivos utilizados trabajan con una distancia de enfoque de 160 mm , medida que cómo se ha mencionado en la sección 2.1.1 es estándar para un gran número de microscopios, por lo tanto para enfocar la imagen correctamente en el plano del sensor, hemos utilizado un tubo con una longitud de 133 mm , con el cuál se cumple la distancia requerida.

3.1.5. Detector

Se ocuparon dos detectores CMOS, ambos de la marca Pixelink, para capturar las imágenes de cada una de las muestras. Los detalles de cada cámara se muestran a continuación.

Pixelink PL-B761U.

El detector CMOS PL-B761U fue una cámara monocromática PL-B761U de 752×480 pixeles, con un tamaño de sensor de $1/3''$ y una salida de 69 fps. Con un rango de tiempo de exposición de 0.05 hasta 2000 milisegundos de exposición. La cámara brinda imágenes de 0.4 MP. Su "Pixel pitch" es de $6\ \mu\text{m}$, el cuál indica el tamaño de pixel, o la distancia que existe de centro a centro entre pixeles. El obturador de la cámara es global (*global shutter*), lo que significa que se captura toda la imagen a la vez, todos los pixeles del sensor se exponen a la luz al mismo tiempo y se leen simultáneamente, [26].

Pixelink PL-B781U

El detector CMOS PL-B781U fue una cámara pixelink PL-B781U, también monocromática. Cuenta con un sensor de 2208×3000 pixeles (6.6 MP), con un "pixel pitch" de $3.5\ \mu\text{m}$. El tamaño de su sensor es de $1''$. Su rango de exposición varía según la región de interés (ROI, en inglés), pero si se ocupa todo el sensor, el detector es capaz de trabajar en un rango de tiempos de exposición de 0.05 hasta 1000 milisegundos. Cuenta con un obturador rodante (o en inglés comúnmente conocido como *rolling shutter*), el cuál captura la imagen línea por línea, de arriba a abajo, donde cada fila de pixeles se expone y se lee en un momento ligeramente diferente, [26].

3.2. Implementación

3.2.1. Diseño mecánico del microscopio

Para el dibujo técnico de las piezas mecánicas que servirán como soporte para el prototipo se trabajó con el programa NX de la empresa Siemens.

El diseño del dispositivo está inspirado en un “sistema de jaula” con tal de formar una estructura rígida y alineada de manera robusta. Dicho sistema le permite al microscopio estar alineado sin importar en que superficie se le coloque.

Sistema de enfoque

El sistema de enfoque del microscopio es diferente a un microscopio convencional, en este prototipo, es el detector (es decir, la cámara) el que debe moverse hasta lograr enfocar la imagen de la muestra, debido a la necesidad inherente de la técnica de un valor fijo de la distancia fuente de luz-muestra generalizada según el tipo de fuente. En el diseño de este mecanismo se ocupó un riel auxiliar, atornillado a la mesa óptica de trabajo, este elemento fungirá como el estatuto de un microscopio óptico convencional, [2]. Además se ocupó un carrito apto para el riel, al cual se le atornilló una escuadra de hierro, que garantizó un ángulo recto con el riel. A esta superficie horizontal de la escuadra, perpendicular al riel, se le atornilló un gato micrométrico. Este sistema, unido a una base lo suficientemente robusta, nos proporcionó un enfoque suave capaz de adquirir imágenes bien enfocadas. El sistema de enfoque se presenta en la Figura 3.3.



Figura 3.3: Sistema de enfoque.

Soportes mecánicos

Cada uno de los elementos ópticos requiere una base rígida capaz de sostenerlos sin que exista algún tipo de holgura o juego entre las bases y dichos elementos ópticos. El diseño del dispositivo tuvo como prioridad la alineación de la matriz de LEDs con el detector, puesto que, como ya se

mencionó en el capítulo 2.7 es de suma importancia para el algoritmo que las posiciones relativas en el dominio frecuencial coincidan con las posiciones espaciales, de esta forma se garantiza la alineación entre el LED central y el centro del detector CMOS utilizado.

Se trabajó con dos tipos de materiales para la fabricación de las bases. Los materiales fueron seleccionados debido a su costo económico y su fácil disponibilidad. Además, estos materiales son lo suficientemente rígidos para soportar el peso de cada componente, sin deformaciones apreciables. El tipo de diseño escogido facilita que cada una de las piezas sea fácilmente reemplazable en caso de que sea requerido.

El primer material utilizado fue acrílico de 6 mm de grosor. Se dibujaron y modelaron tres bases cuadradas, de 220 mm de lado; la base para la fuente de iluminación de 64x64 LEDs, la base de la platina, donde se colocará la muestra y la base de la cámara. Además se diseñó una cuarta base cuadrada de 160 mm que se utiliza como adaptación para colocar sobre la base de la fuente de iluminación grande, la fuente de luz más pequeña. Se realizó el corte de cada pieza con un láser de CO_2 . El modelado del prototipo de acrílico se muestra en la Figura 3.4.

El segundo diseño para las bases, fue utilizando MDF de 5 mm de grosor. Los cortes también fueron realizados con el mismo láser de CO_2 . Este diseño fue específico para la fuente de luz de 8x8 LEDs. Se omitió trabajar con la matriz de 64x64 LEDs teniendo en consideración que el material podría tener una mayor deformación con una sección de área transversal mayor, al momento de soportar la carga de la platina, que el acrílico. En este prototipo solo se dibujaron y modelaron tres bases, con dimensiones de 127 mm por lado; el soporte del detector, el de la platina y el de la fuente de luz. En la Figura 3.5 se muestran modeladas en conjunto.

Para la unión de las bases, en ambos diseños (acrílico y MDF), se utilizaron espárragos de acero inoxidable y tuercas de 1/4". Se mantuvo fija la distancia entre la base para la platina y la base para la matriz, . Para asegurar la misma distancia entre cada esquina se realizó la medición directa con vernier y el apoyo de un nivel de gota. Por otro lado la base del detector se ha dejado móvil. Los cuatro espárragos funcionan como guía para mantener la alineación mientras se enfoca la muestra.

Además se han considerado en el dibujo todos los barrenos para atornillar el detector, la platina y la matriz con sus respectivas bases. Para el diseño de cada pieza se ha considerado correctamente su patrón de montaje o su patrón de fijación, es decir todas las ranuras, barrenos u orificios que debe tener la pieza para permitir que cada componente, mecánica u óptica se alinee y se fije correctamente con otras piezas del ensamblaje. Para llevar a cabo esta tarea se requirió realizar una comprobación previa a la fabricación, en donde se imprimieron en 2D los diseños y se realizó una simulación de ensamblaje con sus respectivos elementos, se sugiere no omitir la prueba para evitar gastos innecesarios en la fabricación.

Piezas y modelados.

Se muestran las piezas dibujadas y sus dimensiones, así como los modelados de cada uno de los prototipos en los diferentes materiales.

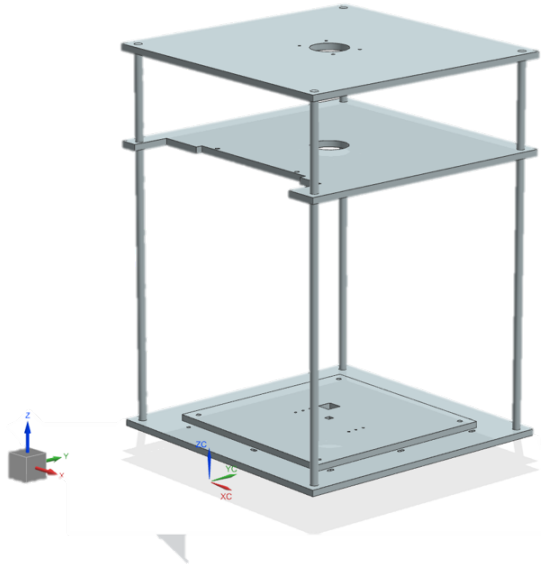


Figura 3.4: Modelo para bases en acrílico.

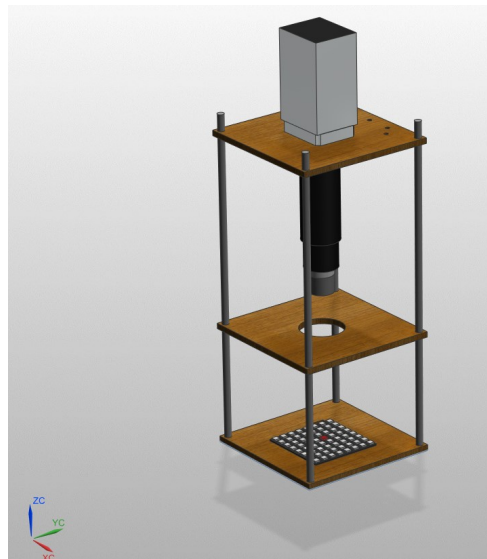


Figura 3.5: Modelo para bases en MDF.

El prototipo experimental de acrílico se muestra en la figura 3.6 y el microscopio fabricado con MDF se muestra en la figura 3.7



Figura 3.6: Prototipo fabricado en acrílico.

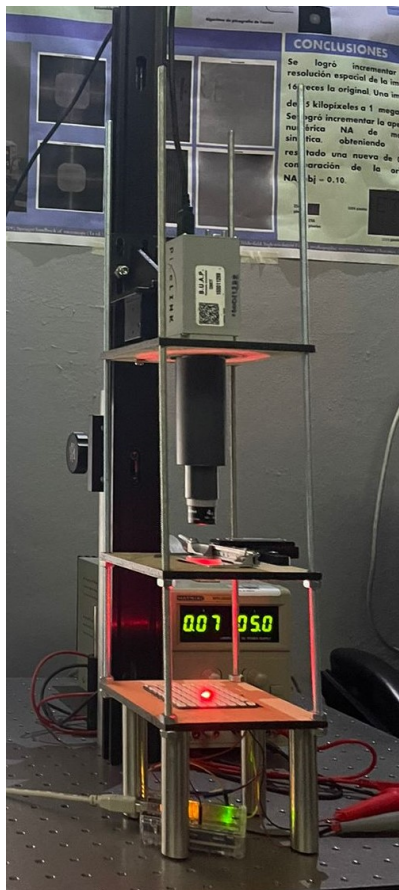


Figura 3.7: Prototipo fabricado en MDF.

3.2.2. Proceso de captura.

Dado que ambos arreglos tienen matrices cuadradas de n elementos, se necesitó trabajar con una submatriz de $n - 1$ elementos, es decir un número impar de LEDs por lado, para que existiera un led central, y se partiera de ahí para realizar el plegado de cada imagen de iluminación oblicua, tal como lo requiere el algoritmo. A continuación se detalla el proceso de captura que se necesitó para cada fuente de luz.

Matriz 8×8 LEDs.

Para esta matriz se ocupó una submatriz de 7×7 LEDs. Se realizaron dos tipos de funciones de secuencia de encendido en Matlab, la primera adquiere las imágenes “en crudo” y sin ningún tipo de tratamiento se llevan al algoritmo PF. La segunda secuencia fue diseñada para realizar un procesamiento de HDR previo a alimentar el algoritmo y es ligeramente más compleja.

Secuencia de encendido de LEDs sin procesamiento.

La función de secuencia de encendido de LEDs para este caso es sencilla y requiere de encender individualmente cada uno de los elementos de izquierda a derecha, comenzando con el primer LED de la esquina superior izquierda, hasta terminar en el LED 49 realizando un movimiento en

forma de zigzag, tal como se muestra en la Figura 3.8.

La programación realizada en Matlab, indica al detector que cada que un LED se enciende, iluminando la muestra, tome 6 fotografías, posteriormente se realiza un promedio de las imágenes para reducir el ruido obtenido, y se almacena la imagen final con el nombre correspondiente al LED que le dio origen. Las cuarenta y nueve imágenes resultantes de este proceso se almacenan ordenadas en un vector para su consecuente uso en el algoritmo de PF.

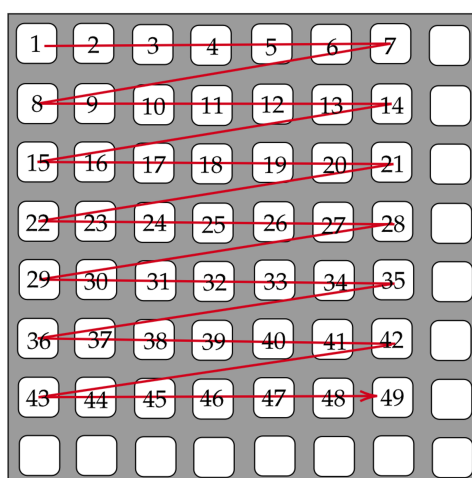


Figura 3.8: Secuencia de encendido para imágenes sin procesar

Secuencia de encendido de LEDs para imágenes con HDR.

La secuencia de encendido en este caso, necesitó definir cinco diferentes regiones de la matriz, a las cuales se ha decidido denominar como zonas. La Figura 3.9 muestra las zonas que se han escogido, por colores con sus respectivas etiquetas.

Cada región tiene asociado un vector de tiempos de exposición diferentes, los cuales se han definido como TE_i , donde el índice i denota la región correspondiente. Los vectores TE_i están conformados por seis tiempos de exposición, cada uno, ordenados de menor a mayor.

Como hemos mencionado en la sección del capítulo 2.6 la función HDR de Matlab necesita al menos 6 tiempos de exposición diferentes para llevarse a cabo. Los tiempos presentados han sido calculados a través de una prueba experimental ya que no demostraron un comportamiento lineal al pasar de una zona a otra. Las zonas se escogieron considerando la simetría radial de la matriz con la finalidad de mantener la menor cantidad de regiones o zonas y así tener un proceso de adquisición más simple.

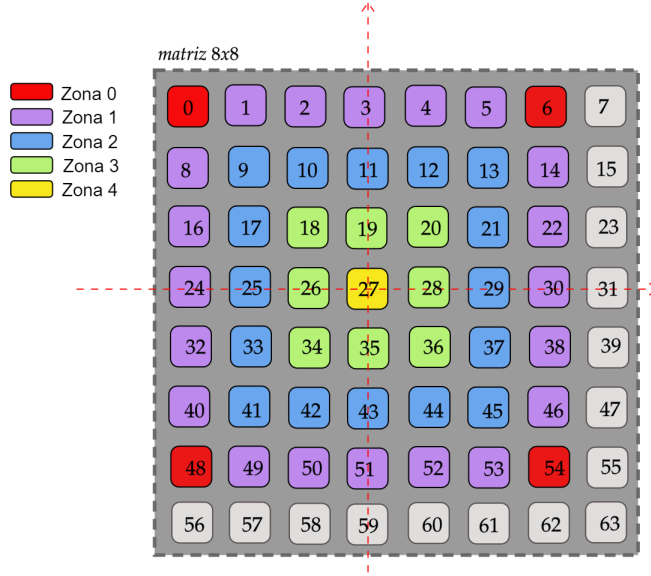


Figura 3.9: Zonas de captura con diferentes vectores de tiempos de exposición

EL conjunto de LEDs correspondientes a cada zona puede ser denotado por los vectores

$$Z_4 = ZC = [27]$$

$$Z_3 = [18, 19, 20, 26, 28, 34, 35, 36]$$

$$Z_2 = [9 : 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41 : 45]$$

$$Z_1 = [1 : 5, 8, 14, 16, 22, 24, 30, 32, 38, 40, 46, 49 : 53]$$

$$Z_0 = [0, 6, 48, 54]$$

Los vectores de tiempo de exposición para cada zona fueron los siguientes;

$$TE_0 = [0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.45] \quad (3.2)$$

$$TE_1 = [0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3] \quad (3.3)$$

$$TE_2 = [0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.125, 0.15] \quad (3.4)$$

$$TE_3 = [0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125] \quad (3.5)$$

$$TE_4 = TE_{central} = [0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1] \quad (3.6)$$

Como se aprecia al analizar todos los conjuntos de tiempos de exposición, se tienen valores repetidos, dando en realidad un total de doce tiempos de exposición diferentes entre sí. Así podemos denotar un vector general TE dado como;

$$TE = [0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.45] \quad (3.7)$$

La secuencia de encendido de LEDs, ocupó el vector TE y un vector auxiliar denominado $LEDs$. Este último vector está conformado por doce componentes. Siendo estas conjuntos de zonas, donde la posición de cada componente está ligada a la posición del valor de tiempo exposición del vector TE que ocupa. La componente "All" denota que ese tiempo de exposición es utilizado en todas las zonas.

$$\begin{aligned}
 LEDs = [& ZC, (ZC \ Z_1 \ Z_2), (ZC \ Z_1 \ Z_2), All, (ZC \ Z_1), All, \\
 & (Z_1 \ Z_2 \ Z_3), (Z_2 \ Z_3 \ Z_4), (Z_3 \ Z_4), (Z_3 \ Z_4), Z_3, Z_4];
 \end{aligned} \tag{3.8}$$

De tal manera que a $LEDs_i$, la i -ésima componente del vector $LEDs$, le corresponde TE_i , la i -ésima componente del vector TE ; es decir, cada zona o conjunto de zonas estará ligada a un único tiempo de exposición en el vector TE .

La función de secuencia de encendido de LEDs de este proceso de captura, consistió en obtener las imágenes según los tiempos de exposición dados por TE_i . De este modo, la programación indica que al encender cada elemento en la matriz, por zonas, en el orden indicado por las componentes del vector $LEDs$, se capturen las imágenes con el tiempo de exposición correspondiente al i -ésimo conjunto. Por ejemplo, si se realiza la captura para el primer tiempo de exposición, la programación indicará a la matriz encender el LED de la zona ZC y el detector capturará la imagen con dicho tiempo de exposición. Para el segundo tiempo de exposición se encenderán los LEDs correspondientes a la zonas indicadas por $LEDs_2$ y análogamente para cada tiempo de exposición.

Como resultado de este algoritmo de captura, se obtienen 294 imágenes en total, que fueron almacenadas como una matriz de cuarenta y nueve filas y seis columnas, cada fila corresponde las imágenes provenientes de un mismo LED, y cada columna es la imagen de un tiempo de exposición dado. Las seis imágenes de cada fila, son utilizadas por la función HDR de Matlab, para generar un conjunto de cuarenta y nueve imágenes con una mejor calidad gracias al tratamiento que se les ha dado, y que posteriormente fueron utilizadas en el algoritmo de PF.

En ninguno de los dos sensores utilizados, se utilizó toda la región del sensor, esto con la finalidad de mejorar el costo computacional. En su lugar se han utilizado sub-regiones del sensor, o regiones de interés (Region of Interest ROI).

Para el caso de las imágenes procesadas con HDR, se utilizó una ROI de 479×479 pixeles, o equivalentemente imágenes de $0.23 MP$. Adquiridas con el detector *PixelinkPL – B761U*. Se trabajó con esta ROI debido a que regiones de mayor tamaño hacían que existiera un error en la adquisición de parte de la función de Matlab con el detector, suponemos que fue debido a saturar la memoria de la cámara. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 3.10.

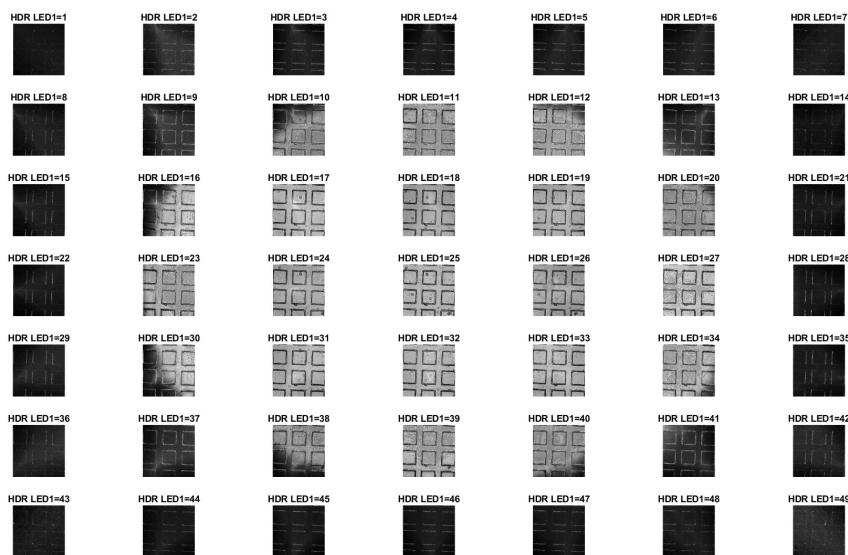


Figura 3.10: Conjunto de imágenes para el patrón de resolución de matriz 7×7 LEDs, con HDR.

Para la adquisición de estas imágenes se ocupó como muestra el patrón de resolución *IIE – 13B*, a una distancia “fuente de luz - muestra” de 200 mm y el objetivo de amplificación $4X$.

En las imágenes sin procesamiento de HDR, se utilizó un ROI de 767×767 píxeles (0.59 MP), el máximo valor para adquirir una región cuadrada para el detector *Pixelink PL – B781U*. En este caso se tuvo la oportunidad de trabajar con una ROI mayor ya que las imágenes no tuvieron procesamiento, y la memoria del detector no tenía inconveniente al adquirir las imágenes.

Para la adquisición de imágenes sin procesamiento se utilizó como patrón de resolución la Reticula *IIE – 13B* a una distancia de 225 mm , con el objetivo de $4X$.

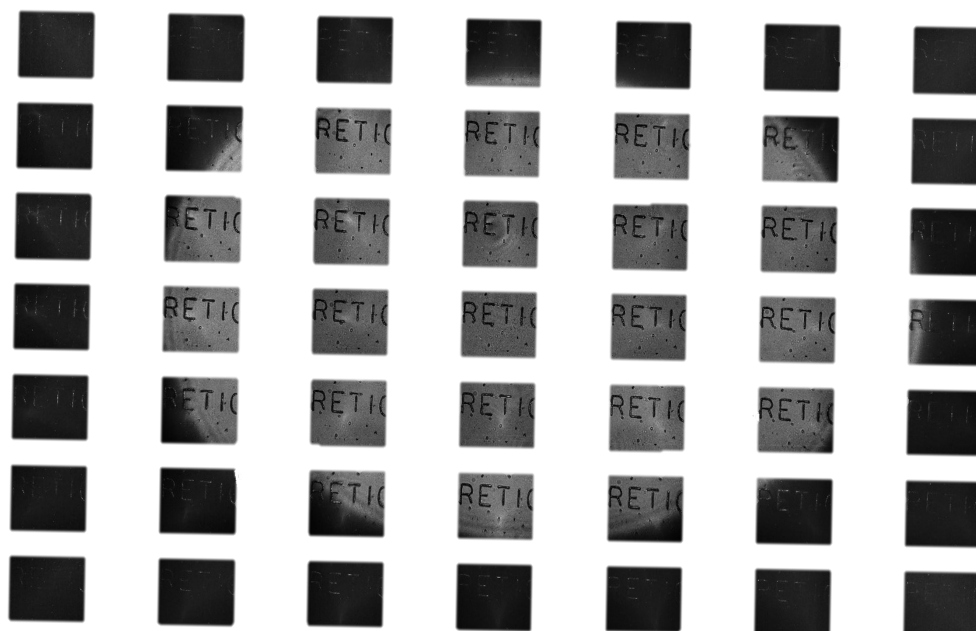


Figura 3.11: Conjunto de imágenes para el patrón de resolución de matriz 7×7 LEDs, sin procesamiento.

También se realizó la adquisición de imágenes para la rejilla de $40 L/mm$, con el mismo objetivo y a la misma distancia, en esta ocasión utilizando el detector Pixelink *PL - B761U* las imágenes capturadas se muestran en la Figura 3.12,

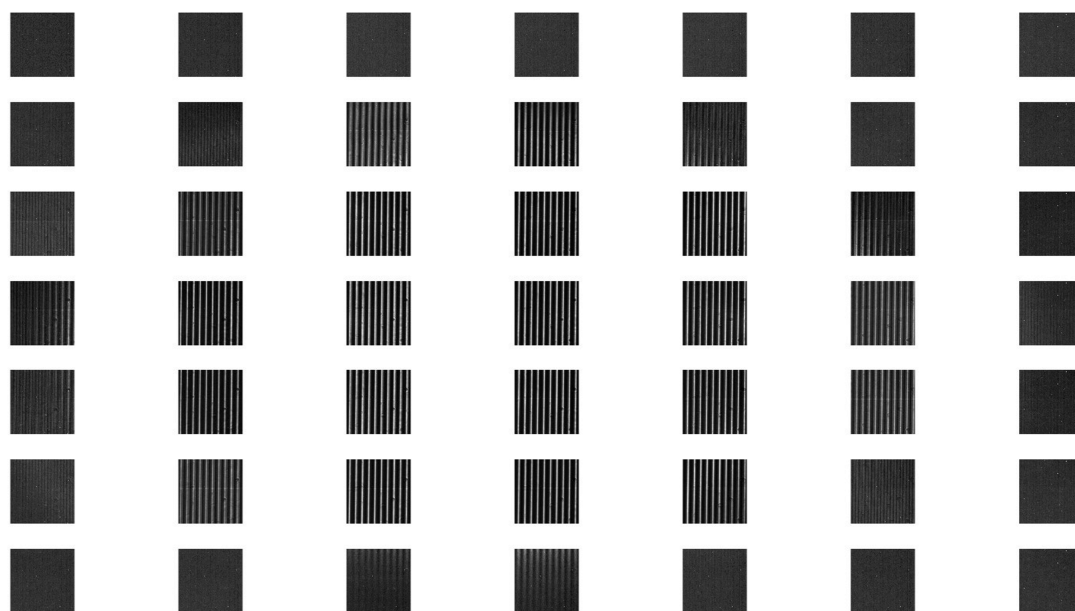


Figura 3.12: Conjunto de imágenes para la rejilla con la matriz 7×7 LEDs, sin procesamiento.

Matriz 64×64

La función de secuencia de encendido de LEDs para la fuente de iluminación de 64×64 elementos, consiste en encender cada uno de los LEDs siguiendo el sentido opuesto de las manecillas del reloj, desde la posición de las 12 en punto, partiendo del LED central en la coordenada (31, 31). La secuencia descrita se muestra en la Figura 3.13.

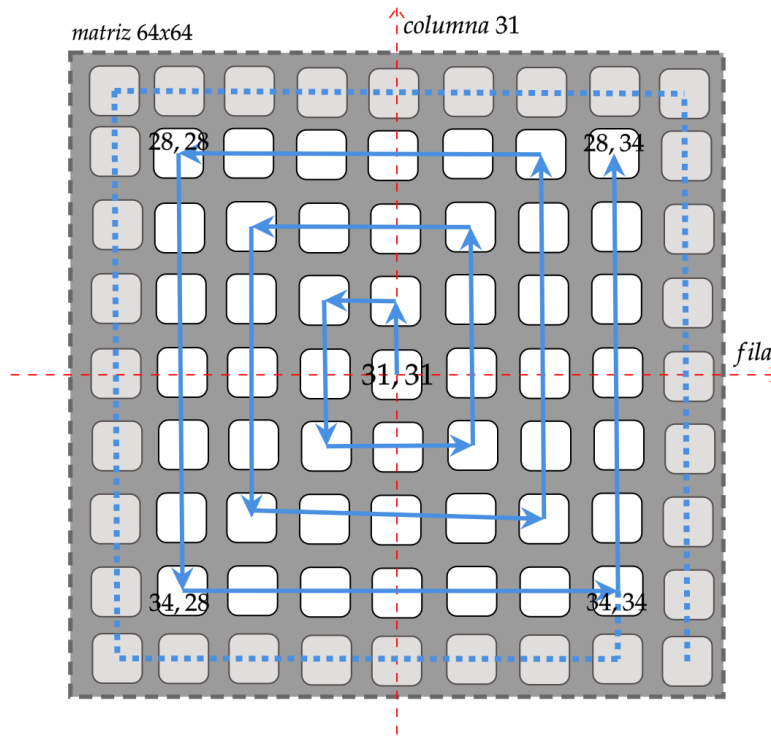


Figura 3.13: Secuencia de encendido en la matriz 64×64 LEDs

La programación, al igual que en el caso anterior fue realizada en Matlab. El proceso de adquisición es similar al caso para la matriz pequeña sin procesamiento de las imágenes, con la única diferencia de seguir una secuencia diferente de encendido y captura. Se indica al detector que cada que un LED se encienda, se adquieran seis fotografías, se promedian las imágenes para reducir el ruido obtenido, y se almacena la imagen final con el nombre correspondiente al LED que le dio origen.

La intención de utilizar esta matriz era ocupar la mayor cantidad de LEDs posibles, para adquirir imágenes iluminadas desde más perspectivas, y en consecuencia, tener una mejor calidad en las imágenes recuperadas, [5]. Sin embargo el proceso de adquisición de imágenes no fue el esperado.

No se contempló, hasta el momento de realizar la captura, que la iluminación provista individualmente por los LEDs era demasiado tenue como para iluminar la muestra a la distancia deseada de 100 mm , [3]. Las soluciones a este inconveniente técnico fueron dos; aumentar el tiempo de exposición del detector, sin embargo, en este caso, un segundo problema surgió. La matriz emitía la luz a una frecuencia semejante a la frecuencia correspondiente para el tiempo de adquisición utilizado, generando interferencias en las imágenes capturadas. Dichas interferencias

eran visualizadas como franjas claras y oscuras a lo ancho de la imagen. Se intentó disminuir el efecto indeseable con diferentes configuraciones para la intensidad de luz de los LEDs y parámetros de la cámara, como la ganancia y el factor gamma.

Disminuir la distancia entre la fuente de luz y el detector podría solucionar el problema de la poca intensidad provista por la fuente; sin embargo, la distancia sería entonces tan pequeña que la luz de los LEDs más allá de la sub-matriz de 3×3 . subtendería un ángulo mayor al que el objetivo del microscopio puede observar, es decir, superaría su abertura numérica. Con esto como justificación se presentan las imágenes obtenidas para el patrón de resolución, Figura 3.14, resultado de llevar a cabo el proceso para la sub-matriz de 3×3 con la muestra del patrón de resolución a una altura de 91 mm , con el objetivo de $4X$.

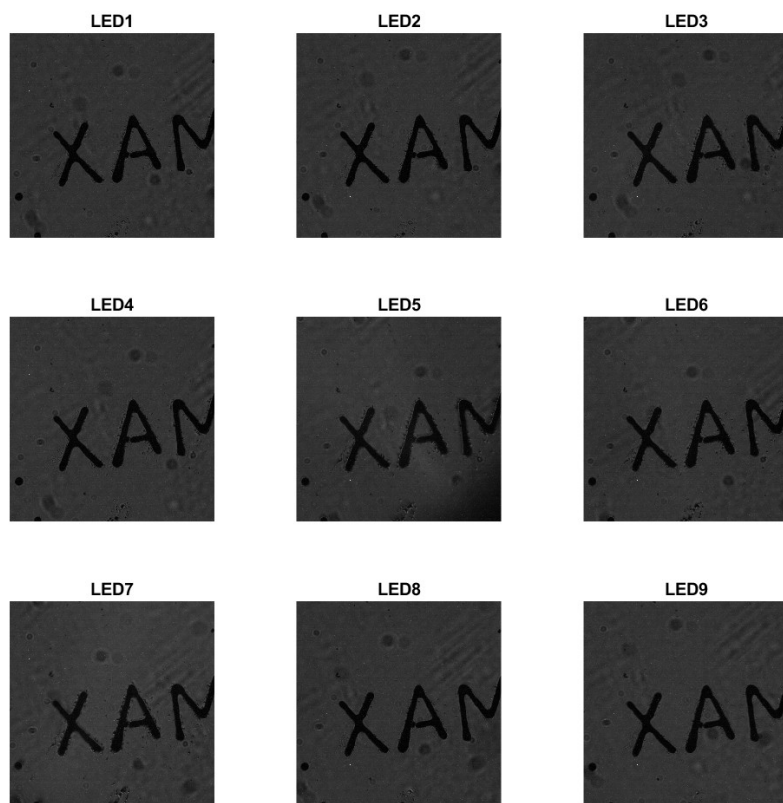


Figura 3.14: Conjunto de imágenes de matriz 3×3 .

3.3. Algoritmo iterativo de pticografía de Fourier.

Con los diferentes conjuntos de imágenes, se puede alimentar el algoritmo computacional de PF. En esta sección se detalla cómo funciona el algoritmo de Pticografía de Fourier implementado en el prototipo experimental. El código del algoritmo se presenta en el apéndice A. En cada apartado importante del algoritmo se ha escrito en paréntesis las secciones o líneas de código correspondientes.

Este algoritmo de PF fue desarrollado en Matlab. Esta plataforma de programación ofrece un entorno potente, flexible y fácil de usar que es particularmente adecuado para el trabajo realizado, debido a sus capacidades de procesamiento de imágenes, visualización avanzada, y soporte para computación de alto rendimiento.

El código inicia cuando el conjunto de N imágenes de baja resolución es cargado en el espacio de trabajo, estas imágenes tendrán el tamaño de ROI (Region of interest) seleccionado en el detector, y corresponden a los N LEDs en la matriz utilizada. (líneas de código 3 -26)

Posteriormente se definen los parámetros físicos del microscopio (Líneas 34-41), los cuáles describimos a continuación

1. h , la distancia entre la fuente de luz y la muestra.
 2. $LEDgap$, la distancia de centro a centro entre LEDs.
 3. sp , el tamaño del pixel, o “pitch pixel” del detector utilizado.
 4. NA , la abertura numérica del objetivo.
 5. λ , la longitud de onda de la fuente utilizada.
- **Se crean los vectores de onda relativos de la iluminación LED.** (líneas de código 54-81)

En esta sección, se asume que cada LED de iluminación crea un campo cuasi-monocromático y espacialmente coherente que ilumina el plano de la muestra desde un ángulo fijo. Si se asume una iluminación espacialmente coherente, esto nos permite modelar el límite de resolución de una imagen de microscopio utilizando una función de transferencia coherente (CTF, por sus siglas en inglés).

Se define el espacio de frecuencias, o el dominio de frecuencial. Recordemos que el vector número de onda es el que proporciona la frecuencia a la que los detalles de la imagen cambian en el espacio, como lo hemos visto en la sección 2.1.5. En el dominio de Fourier, estas frecuencias se representan en radianes por unidad de longitud. Aquí es donde se calculan las posiciones relativas en el dominio espacial de los LEDs en el arreglo y los correspondientes vectores de onda $kx_{relative}$ y $ky_{relative}$.

Cuando el LED es encendido, la onda electromagnética parcialmente coherente tiene un vector de onda \vec{k} cuya magnitud está dada por

$$k = \frac{2\pi}{\lambda}, \quad (3.9)$$

este vector incide con un cierto ángulo θ respecto a la normal del plano del sensor. El ángulo de incidencia con el plano XZ o YZ, es exactamente el mismo, ya que la disposición de los LEDs tiene una distancia de centro a centro entre LEDs igual en ambas direcciones (X y Y).

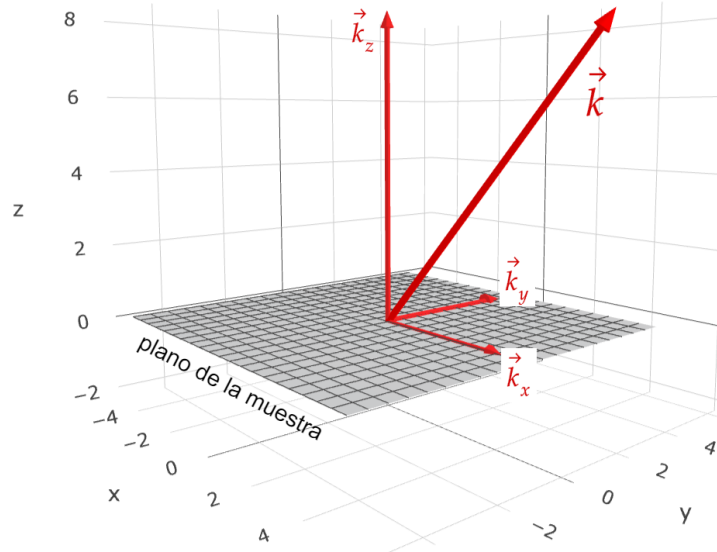


Figura 3.15: Esquema del vector de onda k , proveniente del n -ésimo LED. (Representativo).

Nuestro algoritmo calcula los vectores $\vec{k}_{x_{relativo}}$ y $\vec{k}_{y_{relativo}}$ a partir del seno del ángulo θ , que es fácilmente obtenido de los dos parámetros conocidos: la distancia “fuente de luz - muestra” y la separación entre centros de los LEDs. Como se aprecia en la Figura 3.16.

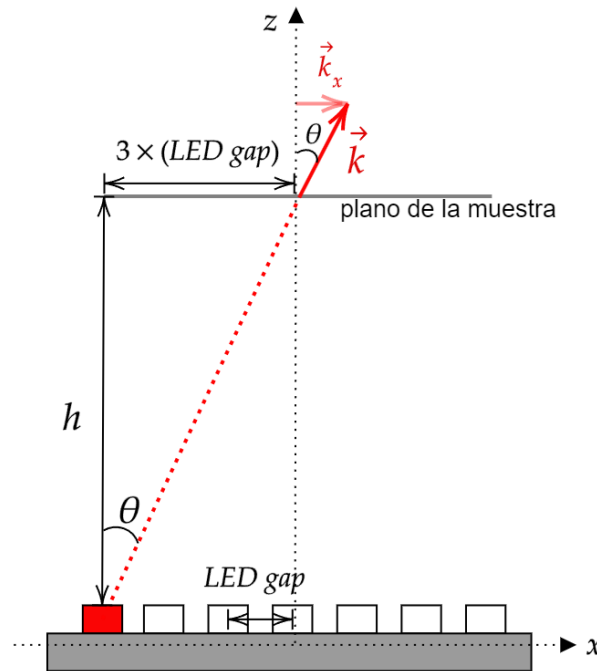


Figura 3.16: Calcular el ángulo θ , a partir de los parámetros del microscopio.

$$\theta = \arctan\left(\frac{LEDgap}{h}\right) \quad (3.10)$$

los vectores \vec{k}_x y \vec{k}_y son calculados como

$$kx = -k * \sin \theta \quad (3.11)$$

y

$$ky = -k * \sin \theta \quad (3.12)$$

para posteriormente ser almacenados como variables. Este cálculo es efectuado para cada uno de los LEDs en la matriz, y para cada posición relativa.

- **Se parametriza el espacio de frecuencias.** (líneas de código 44 - 74)

Para generar la imagen de alta resolución se debe establecer una razón entre el tamaño del píxel de las imágenes de baja resolución (sp) y el tamaño que tendrá el nuevo píxel (np), el cual le pertenecerá a la imagen de alta resolución. Esta razón es el factor de submuestreo, $pratio$, y nos indica cuántos píxeles de la imagen de baja resolución corresponden a un píxel de la imagen de alta resolución. Esto significa que la imagen de alta resolución tiene una densidad de píxeles mucho mayor, permitiendo una mejor representación de los detalles finos, la Figura 3.17 es una representación de cómo funciona el factor de submuestreo. Además, la nueva matriz de tamaño en píxeles $m \times n$ servirá como un “lienzo” para las imagen compleja de alta resolución construida durante el algoritmo.

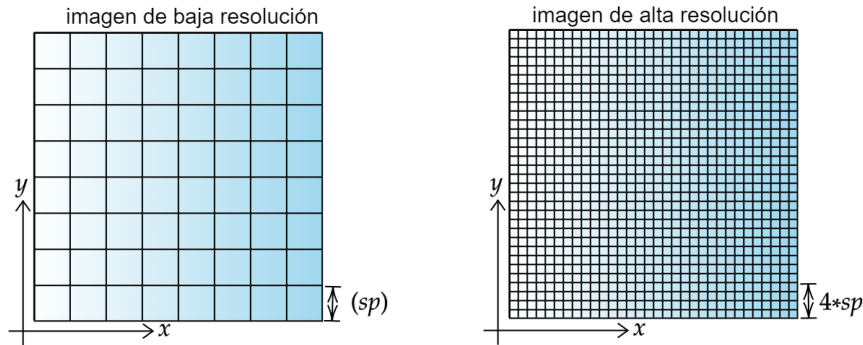


Figura 3.17: El factor de submuestreo define cuántas veces crecerá el número de píxeles en una dimensión respecto a la imagen de baja resolución.

$$pratio = \frac{sp}{np} \quad (3.13)$$

Además, se definen los filtros $NAfilx$ y $NAfily$, correspondientes a la abertura numérica del objetivo utilizado. Estas variables nos permitirán definir la CTF en el espacio de Fourier.

$$NAfilx = \frac{NA}{\lambda} m * np \quad (3.14)$$

$$NAfily = \frac{NA}{\lambda} n * np \quad (3.15)$$

donde m y n corresponden al número de píxeles por lado de la imagen recuperada.

La función de estos filtros es describir al objetivo en el espacio de frecuencias, es decir, su trabajo es no dejar “pasar” frecuencias espaciales mayores a las que el microscopio es capaz de resolver, esto con la finalidad de obtener una reconstrucción precisa de las imágenes recuperadas.

Se considera también, la frecuencia máxima que tienen las imágenes recuperadas, dado el tamaño del nuevo píxel np . Para esto, utilizamos el teorema de Nyquist, abordado en la sección 2.5.1.

Este en resumen, nos dice que la frecuencia de muestreo (el tamaño del *pitch pixel* de la imagen) debe ser al menos el doble de la frecuencia espacial de la señal, o dicho de otra forma la frecuencia espacial máxima que podrá resolver nuestro sistema estará dado por;

$$k_{max} = \frac{2\pi}{2np} = \frac{\pi}{np} \quad (3.16)$$

Esto asegura que la imagen reconstruida capture todos los detalles espaciales posibles dados los límites de resolución impuestos por el tamaño de los píxeles.

En otras palabras, k_{max} define la característica de imagen de microscopio más fina resoluble cuando se ilumina la muestra con un LED en el eje.

La resolución de la imagen, también se puede describir en el espacio de frecuencias, para ello utilizamos los valores dkx y dky como los valores de espaciamiento entre los puntos de muestreo en el dominio frecuencial, que se definen como;

$$dkx = \frac{2\pi}{n * np} \quad (3.17)$$

$$dky = \frac{2\pi}{m * np} \quad (3.18)$$

Finalmente se crea el espacio de frecuencias. Este espacio, es una matriz, que de manera análoga a la matriz de $m \times n$ píxeles en el dominio espacial, actúa como “lienzo” sobre el cuál realizamos el plegado de los patrones de difracción para generar las imágenes recuperadas.

Una vez el espacio de frecuencias ha sido creado, podemos trabajar en él para realizar la optimización iterativa de la imagen de alta resolución.

Secuencia del algoritmo de recuperación de fase de PF.

El algoritmo comienza con un objeto estimado complejo cuya fase inicial es una constante, y cuyas amplitudes están representadas por una matriz de unos, este objeto tiene el tamaño dado por el factor *pratio*. En realidad, cualquier aproximación al objeto puede ser válida en un inicio. Este es solo el punto desde dónde partimos, por esta razón le llamamos objeto aproximado. Figura 3.18.

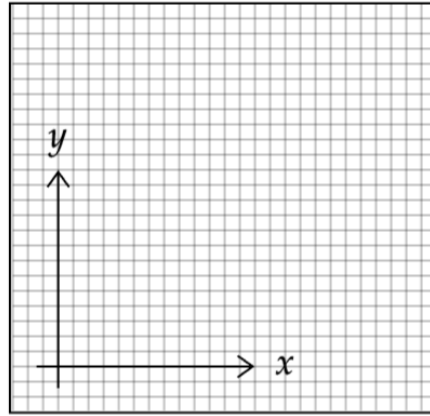


Figura 3.18: Objeto estimado.

El objeto estimado en el código es conseguido a través de la interpolación de la imagen de baja resolución central. En el código esto se realiza en la línea 79, se define al objeto estimado como *him*. En este punto vale la pena recordar al lector que *him* se trata de un objeto complejo, una matriz de números complejos de la forma $Ae^{i\theta}$, y la figura 3.18 es simplemente una representación esquemática para entender el algoritmo.

A este objeto aproximado se le aplica la transformada de Fourier, que nos da como resultado un espectro aproximado de Fourier. Y se realiza en la línea de código 80, en este paso se está pasando del dominio espacial al dominio frecuencial.

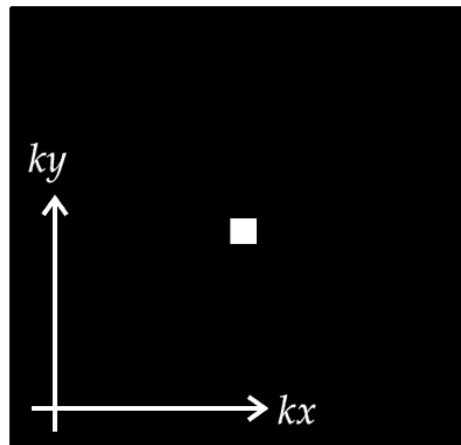


Figura 3.19: Espectro aproximado.

Posteriormente se selecciona, del espectro aproximado, solo un área correspondiente a una imagen de baja resolución, (líneas de código de 90 a la 94), donde la restricción que se tiene para esta área es el objetivo de microscopio, que ha sido previamente definido en el espacio de frecuencias por *fmaskpro* (línea 95). En la figura 3.20 esta restricción es representada por el círculo rojo y en el algoritmo de este prototipo comenzamos con la región o área correspondiente al LED central.

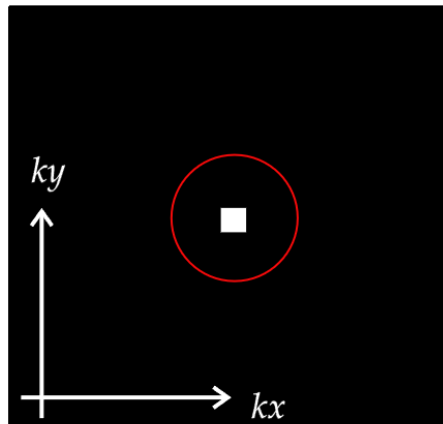


Figura 3.20: Selección de un área correspondiente a una imagen de baja resolución.

A ésta área seleccionada, se le aplicará la transformada inversa de Fourier, para llevarla al dominio espacial (línea 96). Es aquí donde aplicamos una segunda constricción al objeto obtenido, el cuál denominamos objeto aproximado y en el código está denotado por *im_lowFT*, sustituiremos las amplitudes A de este objeto por las raíces de las intensidades capturadas en la imagen de baja resolución capturada con el LED correspondiente a la región seleccionada, en este caso es la imagen obtenida con el LED central, (líneas de código 97 - 99), mientras que la fase φ , será sustituida por los valores obtenidos de aplicar la transformada de Fourier en dicha región.



Figura 3.21: Objeto aproximado de la región escogida en el espacio de frecuencias.

Una vez realizado esto, la región se devuelve al espacio de Fourier y se actualiza en el espectro aproximado (línea 99). Esto se repite para cada uno de las imágenes de baja resolución las cuales tienen asociadas un LED en la matriz (línea 83 a la 103). A este proceso iterativo se le conoce como **proyección alternada** en la literatura.

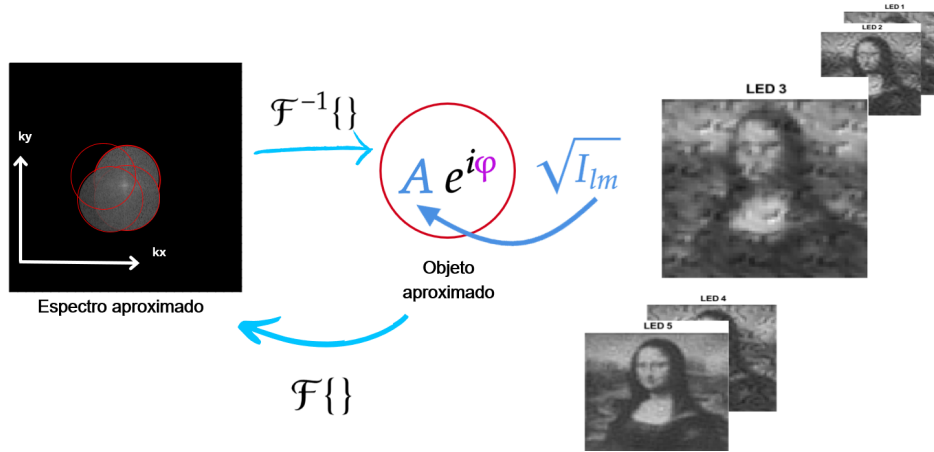


Figura 3.22: Proyección de alternada.

De esta forma se realiza el plegado, que finalmente da lugar a un espectro de Fourier sintético, cuya abertura numérica sintética es más grande que la original obtenida de una sola imagen de baja resolución, gracias a la redundancia de datos que se tiene del plegado.

El plegado de todas las imágenes de baja resolución da lugar a un nuevo espectro, al que denominamos ahora espectro sintético de Fourier Figura 3.23, el cuál puede ser utilizado como el nuevo espectro de Fourier estimado, y se repetirán los pasos de la proyección alternada, este proceso (líneas de código 114- 141) se repite una cantidad definida de *loops* o iteraciones, donde todo el proceso se repite hasta llegar a una solución convergente. La cantidad de *loops* utilizada para este prototipo en sus diferentes visualizaciones fue de 5 hasta 50.

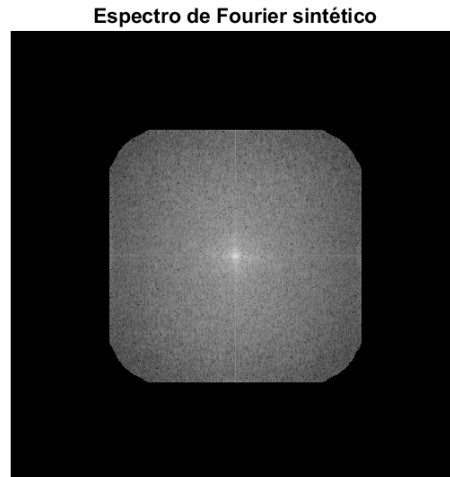


Figura 3.23: Espectro de Fourier sintético.

Se visualizan los resultados Del espectro sintético de Fourier obtenido a partir del algoritmo PF. El cual es una matriz de números complejos de $n \times m$, se le calcula finalmente la transformada inversa de Fourier para volver al dominio espacial. Pero cabe recordar que el objeto matemático obtenido es en realidad una matriz de números

complejos. A esta matriz que denotamos como him , por imagen de alta resolución se le puede extraer la información real para poder ser visualizada como las imágenes de amplitud y de fase, de tal manera que;

$$Amplitud_{recuperada} = abs(him) \quad (3.19)$$

y

$$Fase_{recuperada} = \arctan \left[\frac{Im(him)}{Re(him)} \right] \quad (3.20)$$

Finalmente, los datos de fase crudos que se han obtenido deben pasar por un proceso de “desdoblamiento de fase”, esto debido a que los datos de fase son una función dientes de sierra, debido a las discontinuidades presentes en la función tangente (sus asíntotas). Esto a través de la función de Matlab *phase_unwrap*.

3.3.1. Parámetros físicos y porcentaje de plegado

El porcentaje de plegado de patrones de difracción es un dato numérico que nos indica la cantidad de datos redundantes en los patrones de difracción que se solapan o pliegan. Es decir la razón que existe entre el tamaño de la región de solapamiento y el tamaño del patrón de difracción de baja resolución. Es de suma importancia para el correcto funcionamiento del algoritmo, contar con un mínimo porcentaje de plegado, en la literatura se sugiere alrededor de un 65 % de porcentaje de plegado para asegurar una convergencia rápida.

Para este trabajo el porcentaje de plegado utilizado fue de aproximadamente un 50 % debido a los parámetros físicos empleados.

Capítulo 4

Resultados y discusión

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos para todas las muestras observadas, comenzando con los dos patrones de resolución y concluimos con los resultados para las muestras biológicas observadas.

4.0.1. Patrones de resolución

Rejilla de Ronchi

Para el patrón de resolución se ha utilizado el objetivo de microscopio de $4X$, se ocupó el detector CMOS PL-*B761U* y se capturaron 49 imágenes de baja resolución con la matriz de 7×7 LEDs, de 479 píxeles cada una. Se escogió un *pratio* de 4, por lo que las imágenes de alta resolución tienen dimensiones en píxeles de 1916×1916 . Esto significa que se ha logrado pasar de una imagen de $0.23 MP$ a una imagen de $3.6 MP$.

Con estos parámetros se obtuvo la imagen central de la muestra la cual se muestra en la figura 4.1 Dado a que se escoge un *pratio* de 4 para las imágenes de alta resolución se ha logrado incrementar en un factor de 16 veces la resolución espacial de la imagen. Los parámetros utilizados en el algoritmo corresponden a los empleados en el prototipo experimental;

- $LEDgap = 8 mm$

- $h = 225 mm$

- $sp = 6 \mu m$

- $\lambda = 632.9 nm$

- $NA = 0.1$

El espectro sintético de Fourier obtenido después de un proceso de 10 ciclos de iteración se muestra en la Figura 4.2.

De este espectro como hemos explicado en el apartado 3.2.2 se obtienen las imágenes de amplitud y fase mostradas en la Figura 4.3.

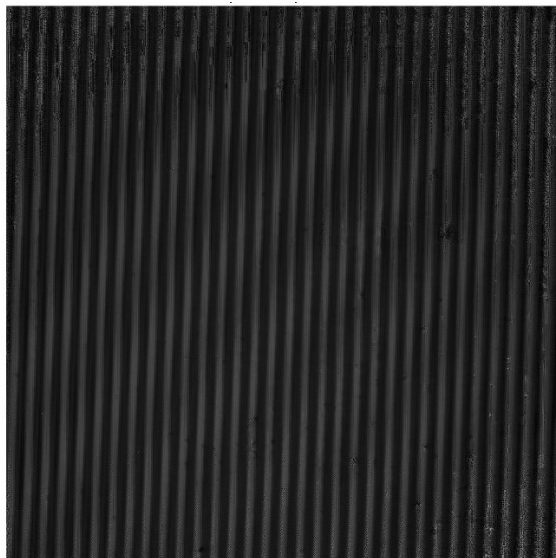
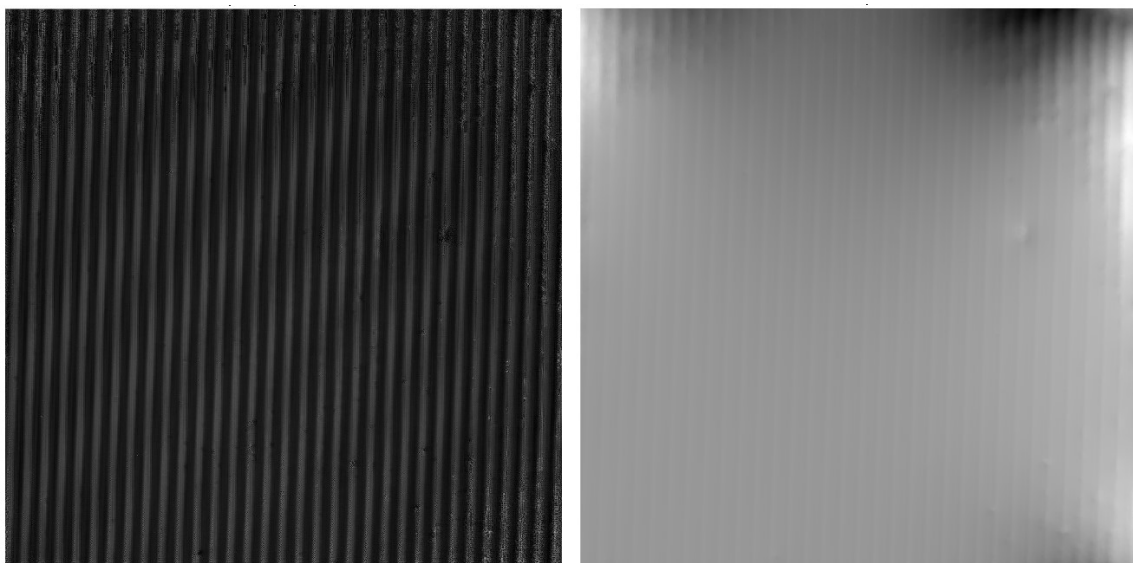


Figura 4.1: Imagen central muestra rejilla



(a) Amplitud recuperada para la rejilla de Ronchi.

(b) Fase recuperada para la rejilla de Ronchi.

Figura 4.3: Imágenes recuperadas de alta resolución para la rejilla de Ronchi.

El cálculo de la abertura numérica sintética se calcula con la ecuación 2.41 con la cual se obtiene una NA sintética de 0.3.

Es interesante observar como en espectro sintético de Fourier se pueden observar frecuencias “picos” verticales en el eje central de la imagen correspondientes a la frecuencia espacial de la rejilla.

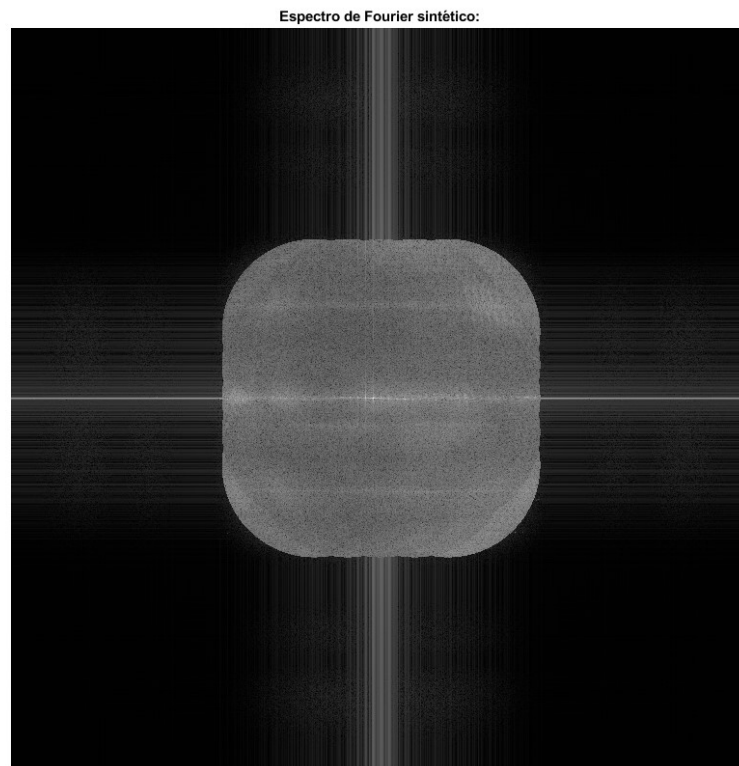


Figura 4.2: Espectro de Fourier sintético para la rejilla de Ronchi.

Retícula II E-13B

Matriz 8×8

Para la retícula de frecuencia variable se escogió la región de las letras “reti”. Se utilizó el detector CMOS PL-B781U, con la región de interés de 767×767 , y el mismo valor de *pratio* y número de iteraciones, los parámetros físicos de esta configuración fueron los siguientes,

- $LEDgap = 8\text{ mm}$
- $h = 200\text{ mm}$
- $sp = 3.5\ \mu\text{m}$
- $\lambda = 632.9\text{ nm}$
- $NA = 0.1$

la imagen central obtenida se muestra en la Figura 4.4

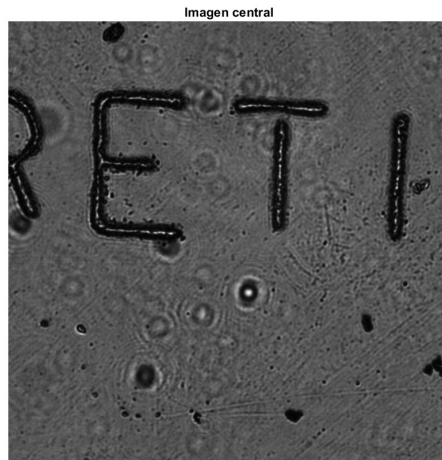


Figura 4.4: Imagen de baja resolución bajo iluminación normal.

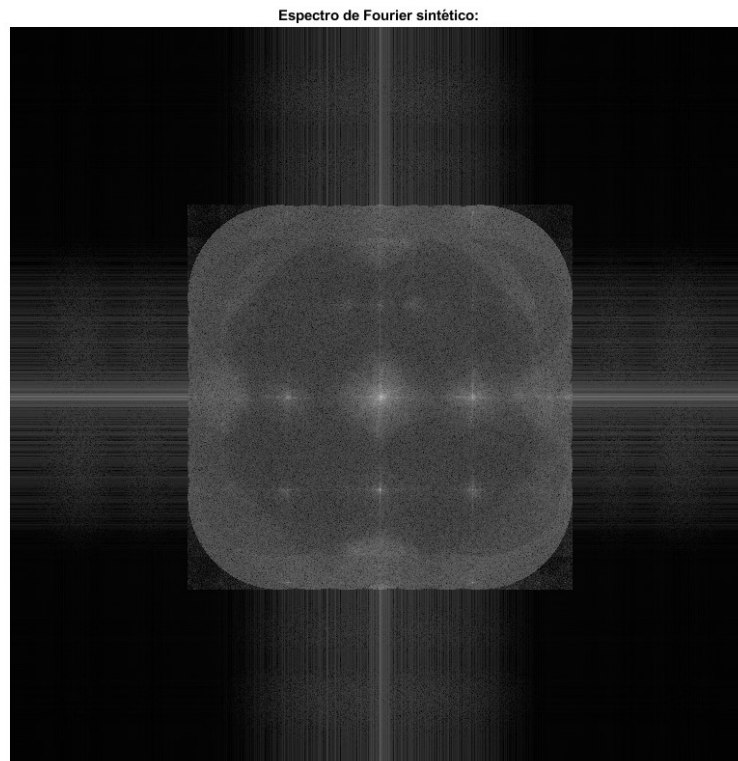
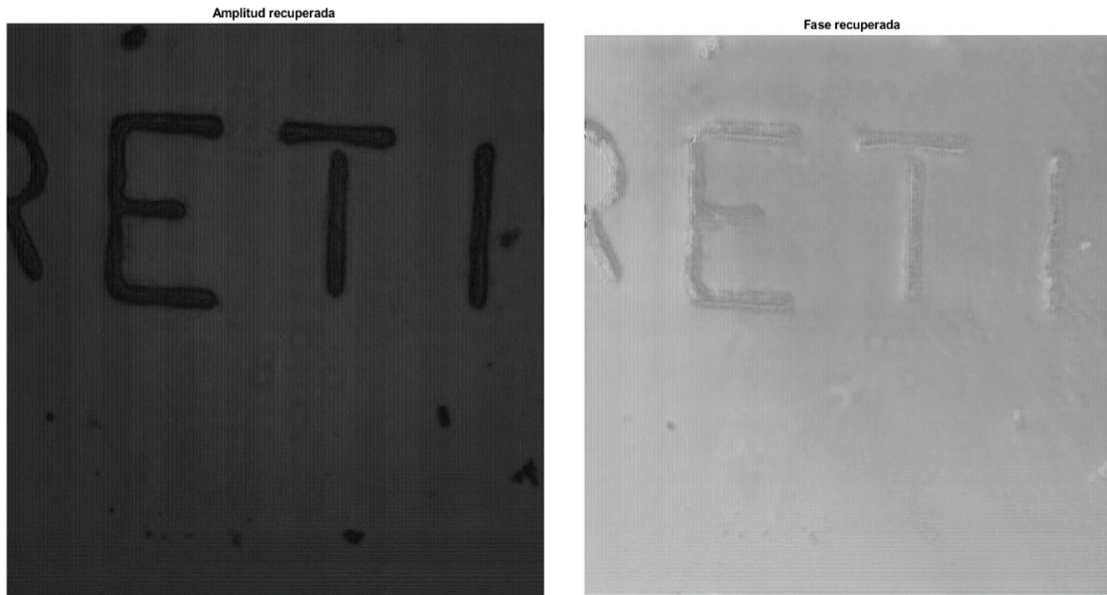


Figura 4.5: Espectro de Fourier sintético para el patrón de resolución.

Estas imágenes fueron sometidas a un filtro gaussiano para mejorar su calidad, resultado que se puede apreciar cualitativamente en comparación con los resultados para la rejilla de Ronchi. La resolución final de ambas imágenes fue de 3068×3068 , por lo que pasamos de imágenes de baja



(a) Amplitud recuperada para la retícula II 13-B.

(b) Fase recuperada para la retícula II 13-B.

Figura 4.6: Imágenes recuperadas de alta resolución para la retícula II 13-B.

resolución de $0.59 MP$ a imágenes de alta resolución de $9.41 MP$. El ocupar un píxel de menor tamaño también mejora ampliamente la calidad de las imágenes recuperadas, ya que para este tamaño de píxel se cumple el criterio de Nyquist.

Matriz 64×64

Se obtuvieron imágenes para el mismo patrón de resolución pero en esta ocasión se utilizó la zona de las letras “MAX”. Se ocupó la matriz de 64×64 , empleando solo una matriz de 3×3 LEDs, debido a las consideraciones técnicas de la matriz abordadas en la sección 3.2.2.

Dado a que el conjunto de imágenes se vio reducido por la matriz utilizada se decidió utilizar nuevamente el detector CMOS PL-B781U, que cuenta con un “pitch pixel” de poco más de la mitad que el del otro detector, para que la calidad de las imágenes no se viera tan comprometida. Dada la poca intensidad brindada de la matriz y el problema que se presentó al recurrir a tiempos de exposición para la cámara elevados se establecieron un factor gamma de 2.2, y una ganancia de 1.8 en el software de la cámara (Pixelink OE) para mejorar la calidad de las imágenes de baja resolución.

También se ocupó una región de interés de 767×767 píxeles con un *pratio* de 4. Los parámetros físicos utilizados varían en comparación con los dos anteriores, y se presentan a continuación,

- $LED_{gap} = 3 mm$
- $h = 91 mm$
- $sp = 3.5 \mu m$
- $\lambda = 632 nm$

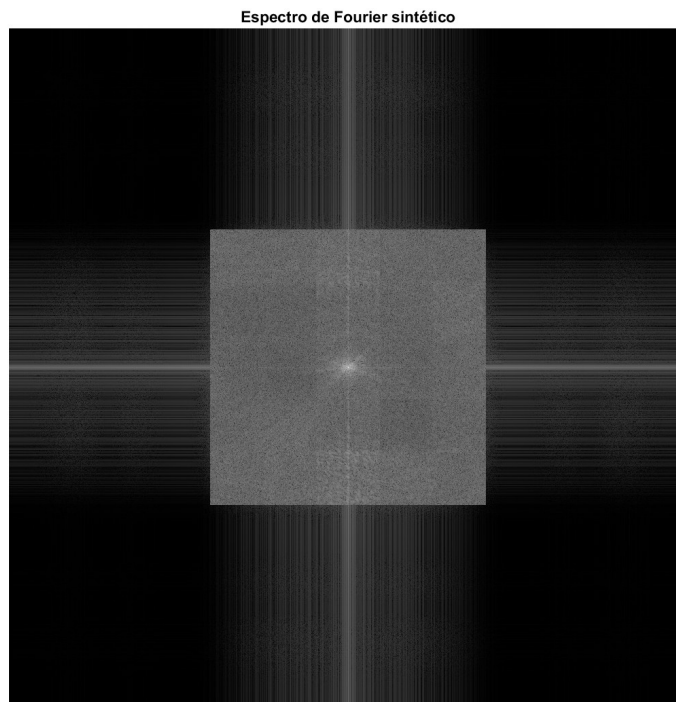


Figura 4.8: Espectro de Fourier para la retícula ocupando una matriz de 3×3 LEDs.

- $NA = 0.1$

La imagen central obtenida para esta configuración se aprecia en la Figura 4.7

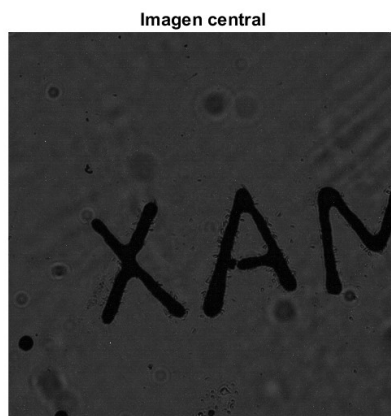
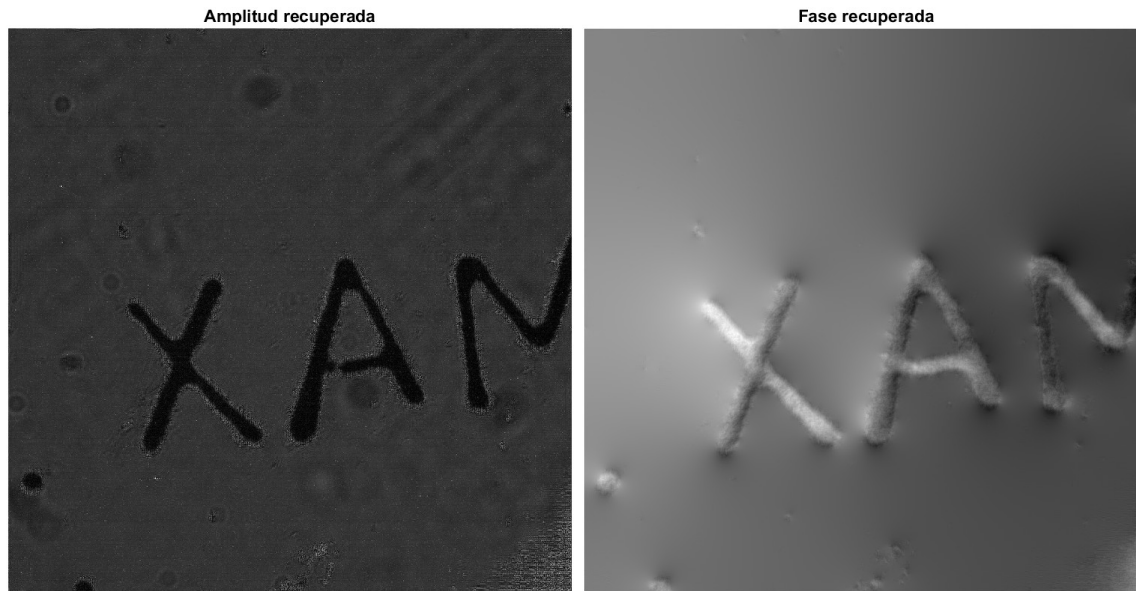


Figura 4.7: Imagen de baja resolución bajo iluminación normal.

El espectro de Fourier obtenido para 10 iteraciones del algoritmo de PF se presenta en la figura

Las imágenes obtenidas a partir del espectro sintético se muestran en la Figura 4.9



(a) Amplitud recuperada para la retícula II 13-B. (b) Fase recuperada para la retícula II 13-B. matriz 3×3 LEDs.

Figura 4.9: Imágenes recuperadas de alta resolución para la retícula II 13-B, matriz 3×3 LEDs.

Se puede apreciar que pese a buscar la mejor calidad posible en las imágenes de baja resolución capturadas, alimentar al algoritmo de PF con tan pocas imágenes afecta en las imágenes de alta resolución recuperadas, puesto que muestran una peor calidad comparada con las imágenes obtenidas anteriormente .

Resultados para imágenes con HDR

Se decidió realizar un proceso previo a cada una de las imágenes de baja resolución antes de ser utilizadas en el algoritmo de PF, el proceso se detalla en la sección 3.2.2. La configuración del prototipo experimental consistió del objetivo de microscopio de $4X$, la matriz de 7×7 LEDs, y el detector PL-*B761U*. Las imágenes corresponden a la región de la retícula donde se pueden observar cuadros de $0.008''$. EL campo de visión del objetivo utilizado nos permite observar aproximadamente 9 cuadros de los antes mencionados.

Los parámetros físicos del prototipo experimental para esta captura fueron los siguientes,

- $LED_{gap} = 8 \text{ mm}$
- $h = 100 \text{ mm}$
- $sp = 6 \mu\text{m}$
- $\lambda = 632.9 \text{ nm}$
- $NA = 0.1$

La imagen central obtenida mediante iluminación normal se muestra en la figura 4.10

El espectro de Fourier obtenido para las imágenes con HDR, se muestra en la Figura 4.11

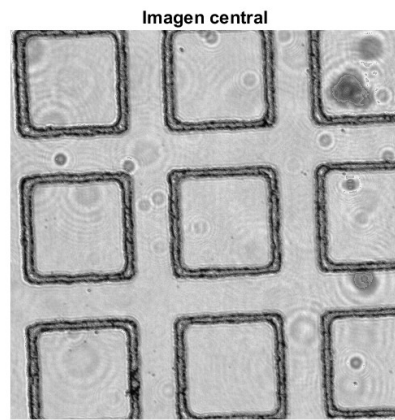


Figura 4.10: Imagen de baja resolución bajo iluminación normal.

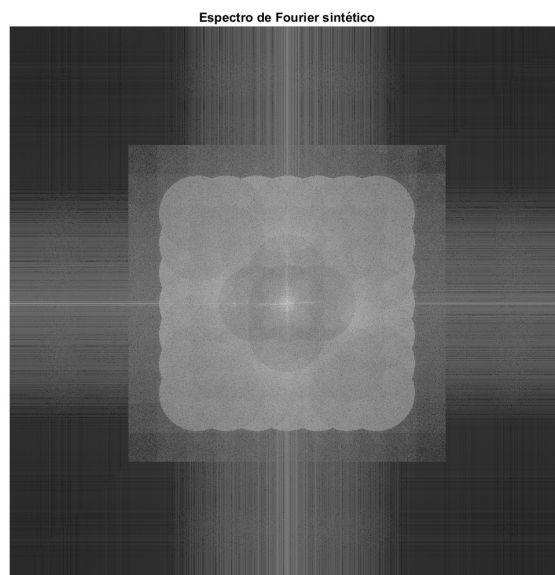
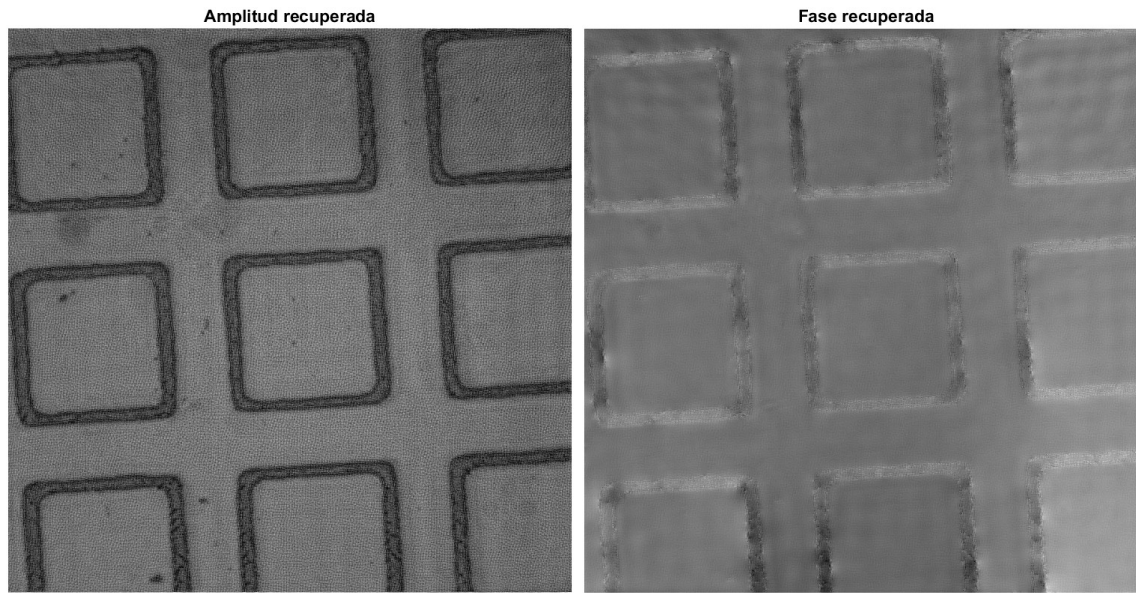


Figura 4.11: Espectro de Fourier obtenido a partir de imágenes con HDR.



(a) Amplitud recuperada para la retícula II 13-B. (b) Fase recuperada para la retícula II 13-B, zona cuadros.

Figura 4.12: Imágenes recuperadas de alta resolución para la retícula II 13-B, zona cuadros.

Los resultados obtenidos muestran una buena calidad, sin embargo las imágenes con HDR parecen afectar a la recuperación de la fase, puesto que esta imagen luce con menor calidad comparados con los resultados de las imágenes de muestras que no tuvieron el procesamiento.

Finalmente quedaba como propósito de este trabajo realizar pruebas con las muestras biológicas. Las pruebas realizadas fueron con el prototipo experimental de la matriz 7×7 LEDs, se ocuparon los objetivos de microscopio de $4X$ y de $10X$, y se utilizó el detector PL-B761U, el cuál ya se encontraba caracterizado para la adquisición de imágenes HDR, con las que se pretendía se obtuvieran las imágenes de más alta calidad.

Los espectros sintéticos, las imágenes de alta resolución recuperadas y parámetros utilizados se describen a continuación.

Ala de libélula

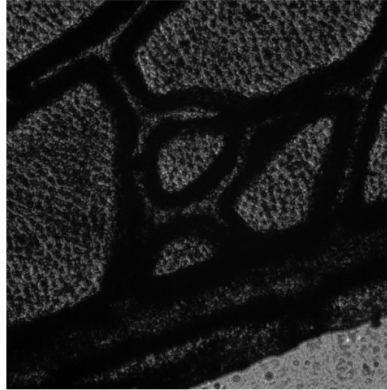
En esta imagen se observa una sección del ala de una libélula, sin ningún tipo de tratamiento, se intenta observar la estructura tridimensional de este tejido.

Los parámetros utilizados fueron los siguientes;

- $LEDgap = 8\text{ mm}$
- $h = 100\text{ mm}$
- $sp = 3.5\ \mu\text{m}$
- $\lambda = 632.9\text{ nm}$
- $NA = 0.1$

con un número ciclos igual a 10 para el algoritmo de PF.

Imagen central



H

Figura 4.13: Imagen de baja resolución proporcionada por el LED central.

Espectro de Fourier sintético

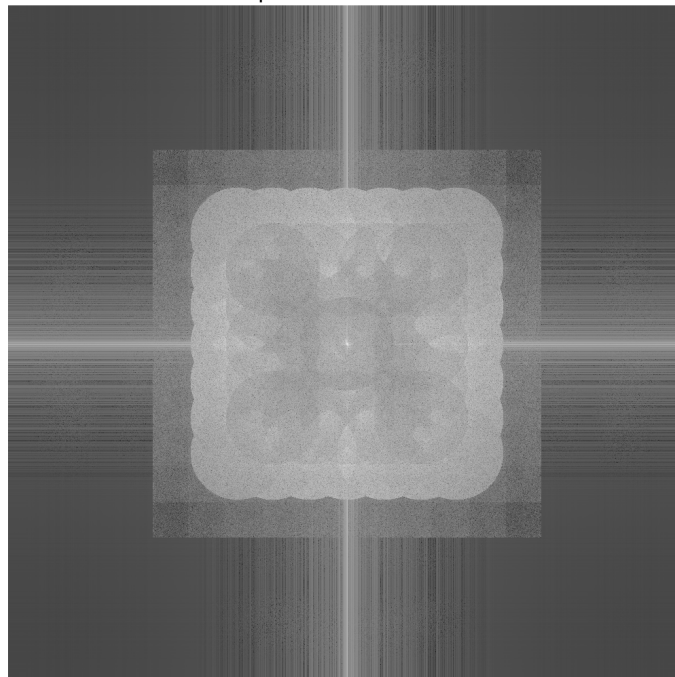
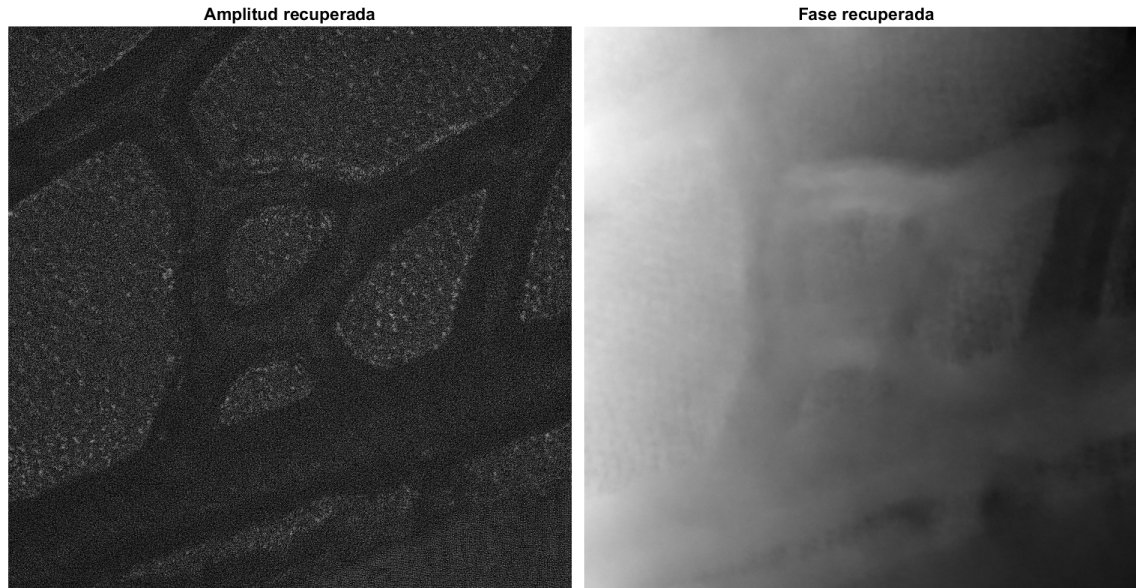


Figura 4.14: Espectro de Fourier para un ala de libélula.

La imagen de iluminación central capturada para esta configuración se muestra a continuación (Figura 4.13)



(a) Amplitud recuperada para la retícula II 13-B.

(b) Fase recuperada para ala de libélula.

Figura 4.15: Imágenes recuperadas de alta resolución para la ala de libélula.

Las estructuras del ala de libélula se aprecian decentemente en la imagen de amplitud recuperada, sin embargo la fase no se aprecia con claridad, y no se podría considerar un resultado aceptable.

Células de piel de manzana 4X

Se trabajó también con una muestra de piel de manzana, las células de la fruta de manzana. Sin tinturar, estas células en forma de estrella generalmente se ven incoloras, lo que dificulta examinar estructuras sutiles. El prototipo experimental presentado nos brinda esa posibilidad gracias a la recuperación de la imagen de fase.

- $LED_{gap} = 8 \text{ mm}$
- $h = 100 \text{ mm}$
- $sp = 3.5 \mu\text{m}$
- $\lambda = 632.9 \text{ nm}$
- $NA = 0.1$

La imagen de baja resolución proporcionada por el LED central se muestra en la Figura 4.16.

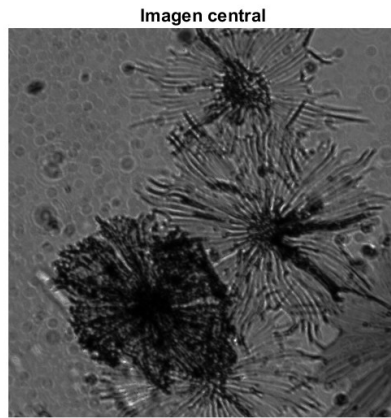


Figura 4.16: Imagen de baja resolución obtenida mediante el LED central.

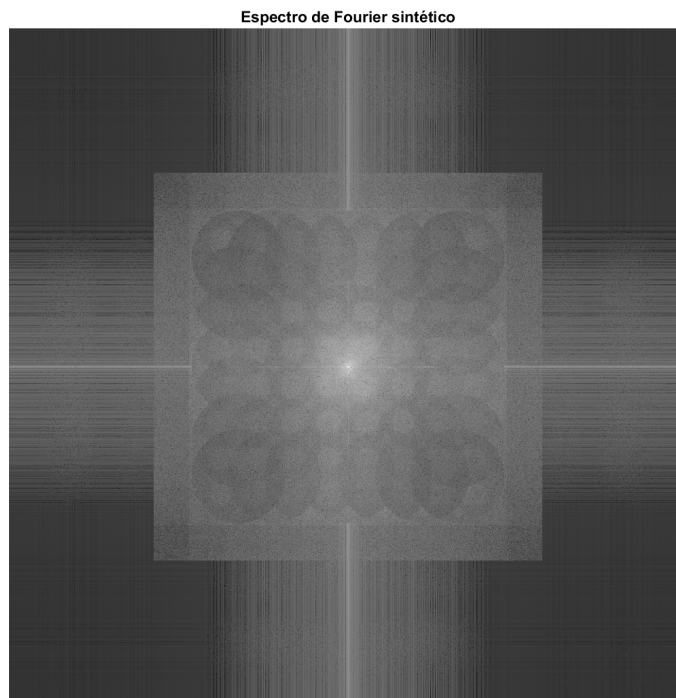


Figura 4.17: Espectro de Fourier sintético para la muestra de piel de manzana.

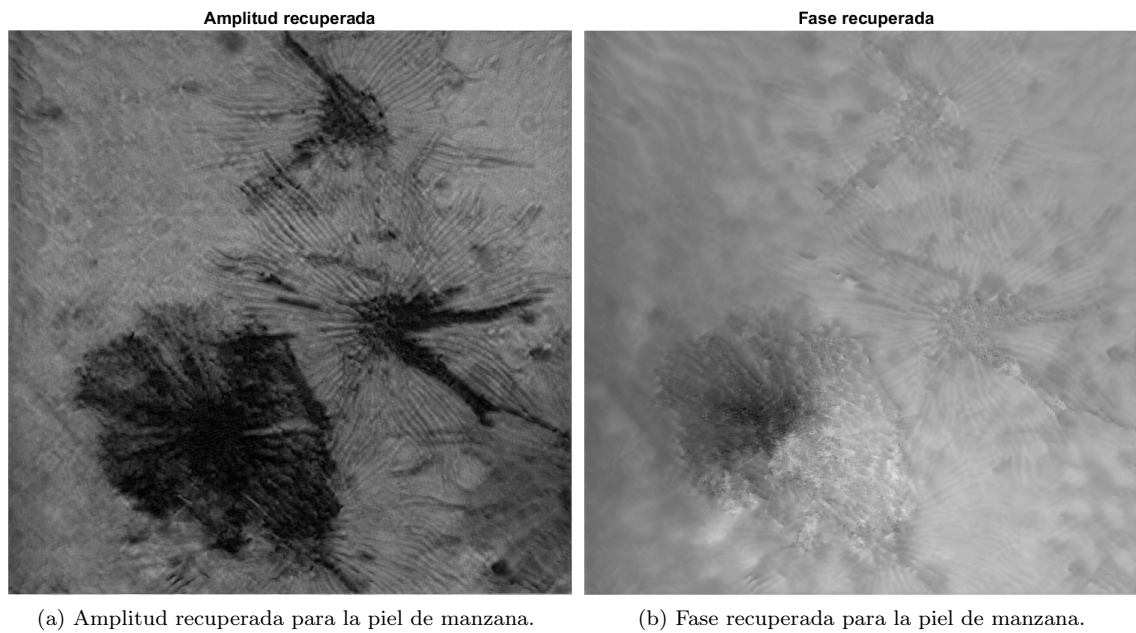


Figura 4.18: Imágenes recuperadas de alta resolución para la piel de manzana con el objetivo de $4x$.

Las imágenes de amplitud y fase recuperadas fueron obtenidas hasta después de iterar el algoritmo de PF hasta 100 ciclos. Como se abordó en la sección 2.7, el algoritmo de Fourier es capaz de corregir errores de calibración gracias a su proceso iterativo. El hecho de necesitar un mayor número de ciclos para converger a resultados medianamente aceptables implica que el prototipo aún tiene fallas lo suficientemente grandes como para evitar la rápida convergencia en muestras de detalles lo suficientemente finos como lo son las células de manzana.

Células de piel de manzana $10X$

También se realizó la observación de la piel de manzana con el objetivo de microscopio de $10X$, la imagen central bajo iluminación normal (Fig. 4.19) y el espectro de Fourier (Fig. 4.20) obtenido se muestra a continuación,

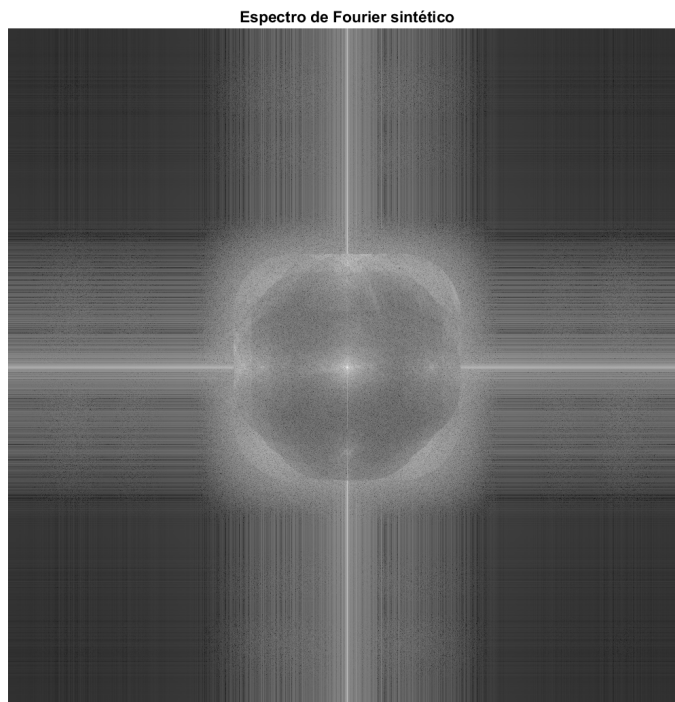


Figura 4.20: Espectro de Fourier sintético para la muestra de piel de manzana con el objetivo de 0.25.

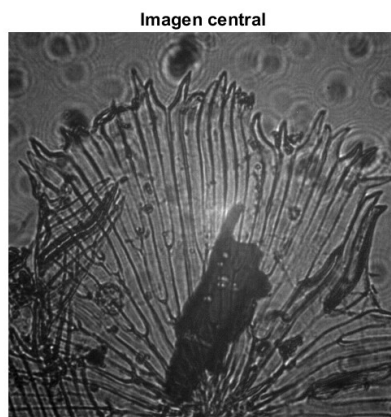
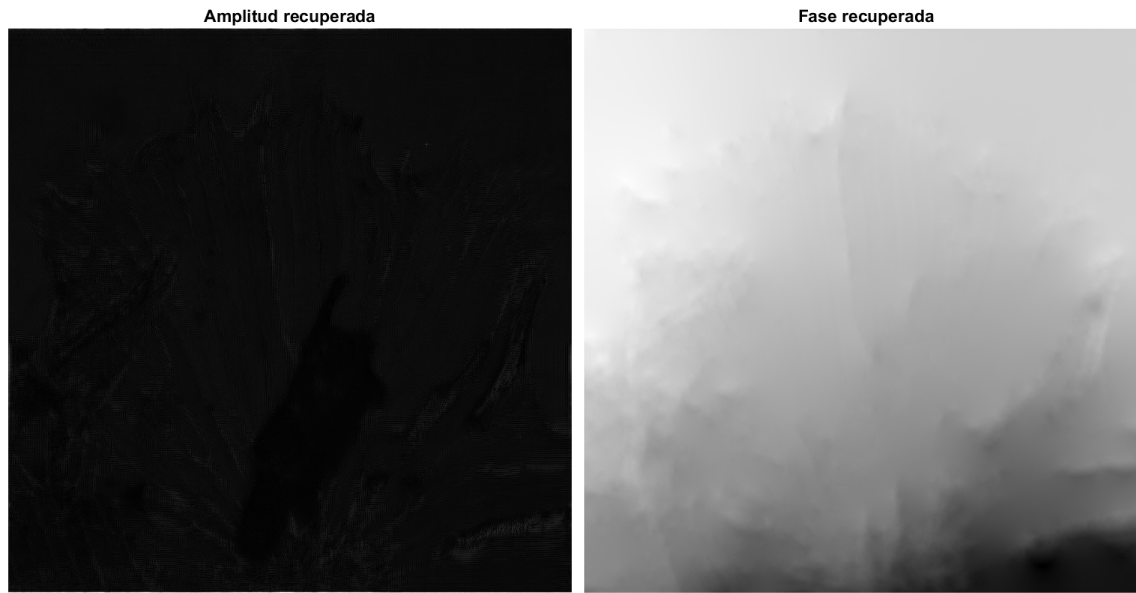


Figura 4.19: Imagen de baja resolución correspondiente al LED central.

Para el caso del objetivo de 10X la recuperación muestra ineficacia, dando como resultado una imagen de amplitud recuperada demasiado oscura, hecho que experimentalmente se adjudica al gran número de iteraciones, la imagen de fase parece de mejor calidad, sin embargo no poseemos de evidencia suficiente para afirmar que es la fase correcta de la muestra.

Se observaron también las células de madera de pino y células de cerebro de ratón sin resultados positivos, aún cuando las imágenes de resolución se sometieron a 1000 iteraciones en el algoritmo



(a) Amplitud recuperada para la muestra de piel de manzana. (b) Fase recuperada para la retícula II 13-B. zona cuadros.

Figura 4.21: Imágenes recuperadas de alta resolución para la muestra de piel de manzana 10x.

PF.

Capítulo 5

Conclusión

La microscopía PF es de gran interés debido a sus bajos costos de desarrollo y su alcance técnico-científico pues permite la observación de muestras delgadas con una gran resolución sin la necesidad de equipo de laboratorio complejo y costoso. Por ello el desarrollo de un dispositivo que emplee la técnica de PF es muy beneficioso, no solo para la comunidad científica, sino también para centros de salud en la observación de muestras rápidas, algunos sectores de la industria que requieran imágenes microscópicas de alta resolución, la docencia y la divulgación.

Este primer prototipo de microscopía de pticografía de Fourier sienta las bases para desarrollar nuevos diseños y sobre todo optimizar el que ya se tiene. El prototipo experimental se puede considerar funcional para muestras cuyos detalles finos no excedan más $0.25 \times 10^{-3} m$ los detalles más finos observados fueron para la rejilla de Ronchi de $40 L/mm$. Resolver objetos más pequeños implicará una necesidad de aumentar el número ciclos en el algoritmo de Fourier, lo que es inconveniente en tiempo de procesamiento y no garantiza una buena calidad en las imágenes recuperadas, ya que si bien pueden conseguir el incremento de la resolución espacial, dichas imágenes pueden contener artefactos o aberraciones indeseadas.

Como trabajo a futuro se sugiere realizar pruebas con muestras biológicas para que puedan ser analizadas por investigadores fisiólogos de la universidad. Otra de las mejoras que pueden ser implementadas a futuro es reemplazar el detector CMOS por la cámara de un smartphone permitiría brindar calidad de imágenes, debido a la tecnología de adquisición con las que cuentan estos dispositivos (HDR, o el autoenfoco) además que permitiría que el dispositivo portátil sea aún más práctico y ligero. Implementar la técnica de pticografía a color sería de utilidad en muestras biológicas para algunos estudios y permitiría observar mejor algunos detalles de las imágenes.

Apéndice A

Código del algoritmo PF implementado.

En el presente apéndice se le proporciona al lector interesado en llevar a cabo su propio prototipo el código empleado en este prototipo, desarrollado en MATLAB.

```
1  %% Algoritmo de PTICOGRAFÍA DE FOURIER
2
3  clc, clear all, close all % CIERRA TODO LO QUE HAY EN PANTALLA y limpia el espacio de trabajo
4  addpath(genpath(pwd)); % Añade las funciones utilizadas por el algoritmo
5  %% Se cargan las imágenes de baja resolución
6  archivo='reti';
7  load([archivo, '.mat'])
8  % Se recortan las imágenes, a un tamaño cuadrado
9  rec==767;
10 M=size(Raw,1);
11 N=size(Raw,2);
12 nd=size(Raw,3);
13 imSeqLowRes=zeros(rec+1,rec+1,nd);
14 for i=1:nd
15     aux=Raw(:, :, i);
16     imSeqLowRes(:, :, i)=aux(M/2-rec/2:M/2+rec/2, N/2-rec/2:N/2+rec/2);
17 end
18 %% (Opción de RECORTE DE LAS IMÁGENES PROCESADAS CON HDR)
19 % rec=478;
20 % [M,N]=size(hdr_Led{1,1});
21 % nd=size(hdr_Led,2);
22 % imSeqLowRes=zeros(rec+1,rec+1,nd);
23 % for i=1:nd
24 %     aux=hdr_Led{1,i};
25 %     imSeqLowRes(:, :, i)=aux(M/2-rec/2:M/2+rec/2, N/2-rec/2:N/2+rec/2);
26 % end
27
28 %% CICLOS
29 % Se establece el número de ciclos a iterar
30 loops=10;
31
32 %% PARÁMETROS EN MILÍMETROS
33
34 nn=sqrt(size(imSeqLowRes,3)); %Tamaño de matriz de leds
35 LEDgap=8; % Distancia entre centro a centro de leds dado en mm.
36 LEDheight=100; % Distancia entre la matriz de LEDs y la muestra dado en mm.
37 wlength=632e-9; % Longitud de onda de la fuente.
38 spsize=3.5e-6; % Tamaño del paso del píxel del detector.
39 psize=spsize/9; % %Se cambia el tamaño de píxel final de la imagen reconstruida
40 %(teorema de muestreo)
```

Código del algoritmo PF implementado.

```

41 NA=0.1; % NA=0.10 -> 4X o 5X (apertura numérica y aumento de la lente)
42
43 %% CREACIÓN DE LOS VECTORES DE ONDA DE LA ILUMINACIÓN LED
44 arraysize=nn;
45 xlocation=zeros(1,arraysize^2);
46 ylocation=zeros(1,arraysize^2);
47 for i=1:arraysize
48     xlocation(1,1+arraysize*(i-1):nn+arraysize*(i-1))=(-(arraysize-1)/2:1:(arraysize-1)/2)*LEDgap;
49     ylocation(1,1+arraysize*(i-1):nn+arraysize*(i-1))=((arraysize-1)/2-(i-1))*LEDgap;
50 end
51 kx_relative=-sin(atan(xlocation/LEDheight));
52 ky_relative=-sin(atan((ylocation)/LEDheight));
53
54 %% Parametrización del espacio de frecuencias (k-space)
55 % Se crea un espacio con las dimensiones de las imágenes de baja resolución y el # de imágenes
56 [m1, n1, numim] = size(imSeqLowRes);
57 % Se establece el radio de submuestreo
58 pratio = round(spsize/psize);
59 % Se establece la cantidad de píxeles que tendrá la imagen de alta resolución.
60 m = pratio*m1; n = pratio*n1;
61 % Se define el vector k0
62 k0 = 2*pi/wlength;
63 % Describimos los vectores kx y ky
64 kx = k0*kx_relative; ky = k0*ky_relative;
65 NAfilx = NA*(1/wlength)*n*psize; NAfily = NA*(1/wlength)*m*psize; % m1*spsize = m*psize
66 % El vector de onda máximo de la función de transferencia óptica
67 kmax = pi/psize;
68
69 dkx = 2*pi/(psize*n); dky = 2*pi/(psize*m);
70 kx2 = -kmax:kmax/((n-1)/2):kmax; ky2 = -kmax:kmax/((m-1)/2):kmax; % odd N
71 [kxm, kym] = meshgrid(kx2,ky2); kzm = sqrt(k0^2-kxm.^2-kym.^2);
72
73 [M1, N1] = meshgrid(1:m1,1:n1);
74 fmaskpro = 1.*double(((N1-(m1+1)/2)/NAfily).^2+((M1-(n1+1)/2)/NAfilx).^2<=1);
75
76 %% Recuperación del objeto (amplitud y fase)
77
78 seq=gseq(arraysize); % Define el orden del plegado (desde el centro en forma de espiral)
79 him = imresize(sum(imSeqLowRes,3),[m,n]);
80 himFT = fftshift(fft2(him));
81 %% main part to optimize estimate of high-res image
82
83 %% main part to optimize estimate of high-res image
84
85 for i = 1:2 % 2 initial iterations to get a rough estimate of high-res image
86     for i3=1:arraysize^2
87         i2=seq(i3);
88
89         % when the image size is even, there will be a half pixel displacement for the center
90         kxc=round((n+1)/2-kx(1,i2)/dkx);
91         kyc=round((m+1)/2-ky(1,i2)/dky);
92         kyl=round(kyc-(m1-1)/2); kyh=round(kyc+(m1-1)/2);

```

Código del algoritmo PF implementado.

```

93     kxl=round(kxc-(n1-1)/2);kxh=round(kxc+(n1-1)/2);
94     O_j=himFT(kyl:kyh,kxl:kxh);
95     lowFT=O_j.*fmaskpro;
96     im_lowFT=ifft2(fftshift(lowFT));
97     updatetemp=pratio^2.*imSeqLowRes(:,:,i2);
98     im_lowFT=updatetemp.*exp(1j.*angle(im_lowFT));
99     lowFT_p=fftshift(fft2(im_lowFT));
100    figure(15);
101    subplot(arraysize,arraysize,i2); imshow(log(abs(lowFT)),[]); title([ num2str(i3), ' Leds' ])
102    himFT(kyl:kyh,kxl:kxh)=himFT(kyl:kyh,kxl:kxh)+conj(fmaskpro)./(max(max((abs(fmaskpro).^2)))
103    end
104 end
105
106 alpha=1;
107 gamma_obj=1;
108 gamma_p=1;
109 beta=1;
110 counting = 0;
111
112 tt = ones(1,loops*arraysize^2);
113
114 for i = 1:loops
115     for i3 = 1:arraysize^2
116         i2=seq(i3);
117         counting=counting+1;
118         kxc=round((n+1)/2-kx(1,i2)/dkx);
119         kyc=round((m+1)/2-ky(1,i2)/dky);
120         kyl=round(kyc-(m1-1)/2);kyh=round(kyc+(m1-1)/2);
121         kxl=round(kxc-(n1-1)/2);kxh=round(kxc+(n1-1)/2);
122         O_j=himFT(kyl:kyh,kxl:kxh);
123         lowFT=O_j.*fmaskpro;
124         im_lowFT=ifft2(fftshift(lowFT));
125         tt(1,i2+(i-1)*numim)=(mean(mean(abs(im_lowFT)))/mean(mean(pratio^2...
126         *abs(imSeqLowRes(:,:,i2))))); % LED intensity correction
127
128         if i>2
129             imSeqLowRes(:,:,i2)=imSeqLowRes(:,:,i2).*tt(1,i2+(i-1)*numim);
130         end
131
132
133         lowFT_p=fftshift(fft2(im_lowFT));
134
135         himFT(kyl:kyh,kxl:kxh)=himFT(kyl:kyh,kxl:kxh)+...
136         gamma_obj.*conj(fmaskpro).*((lowFT_p-lowFT))./((1-alpha).*abs(fmaskpro).^2...
137         + alpha.*max(max(abs(fmaskpro).^2)));
138
139         fmaskpro=fmaskpro+gamma_p.*conj(O_j).*((lowFT_p-lowFT))./((1-beta).*abs(O_j).^2 + ...
140         beta.*max(max(abs(O_j).^2)));
141     end
142 end
143
144 him=ifft2(fftshift(himFT));

```

```

145
146 %% Se visualizan los patrones de difracción
147 figure();imshow(log(1+(abs(himFT))),[]); title('Espectro de Fourier sintético : ');
148 %% Área de resultados
149 % Recuperamos la información de fase
150 Fase_recuperada=angle(him);
151 % Se desenvuelve la fase
152 Fase_recuperada=phase_unwrap(Fase_recuperada);
153 Fase_recuperada=Fase_recuperada-min(min(Fase_recuperada));
154 % Recuperamos la información de amplitud
155 Amplitud_recuperada=abs(him);
156 Amplitud_recuperada=Amplitud_recuperada-min(min(Amplitud_recuperada));
157
158 %% Se visualizan la AMPLITUD Y FASE RECUPERADAS
159 figure('Name','PRESENTACIÓN DE RESULTADOS');
160 subplot(1,2,1); imshow(sqrt(Amplitud_recuperada),[]); title('Amplitud recuperada');
161 subplot(1,2,2); imshow(Fase_recuperada,[]); title('Fase recuperada');
162
163 %% Se visualiza la imagen central de baja resolución
164 figure();
165 imshow(imSeqLowRes(:,:,25),[]);title('Imagen central');

```

A.0.1. Algoritmos auxiliares para el proceso de captura de las imágenes de baja resolución.

Imágenes sin procesamiento

```

1  clc, clear all, close all
2  %% Agrega los subfolder al Folder de trabajo
3  addpath(genpath(pwd));
4  delete(instrfind);
5  instrfind
6  Pso=serial('COM3','BaudRate',9600);
7  get(Pso)
8  fopen(Pso);
9  pause(2);
10 instrfind
11 % Define qué cámara vas a utilizar
12 vid=videoinput('pixelinkimaq'); %Para PIXELINK
13 pause(0.1);
14
15 %% PARAMETROS DE LO CAMARA
16
17 src=getselectedsource(vid);
18 set(src,'FlipHorizontal','on');
19 set(src,'FlipVertical','on');
20 set(src,'Exposure',0.1);
21
22 %% Adquisición de las imágenes
23 Matriz=7;
24 % (Adquisicion_pticografia(Pso, Rojo, Verde, Azul, Intensidad, vid, Matriz))
25 [Raw]=Adquisicion_pticografia(Pso,255,0,0,255,vid,Matriz);

```

Código del algoritmo PF implementado.

```
26 %% Guardas los archivos en formato .mat
27 datos.TE=get(src, 'Exposure');
28 datos.wavelength=632e-9;
29 datos.LedGap=8;
30 datos.h=100; % leds a muestra
31 datos.pitchpixel=6.6e-6;
32 datos.NA=0.1;
33
34 %% Recuerda poner nombre a tus imágenes
35 prompt = "¿Qué muestra estás observando? ";
36 muestra = input(prompt);
37 %% Guarda las imágenes de baja resolución
38
39 save([pwd, '\Datos\Cerebro\', archivo, '.mat'], 'Raw', 'datos');
40 %% Muestra imagenes capturas
41 figure(2);
42 for im=1:Matriz^2
43     subplot(Matriz,Matriz,im);imshow(Raw(:,:,im), []);
44 end
45
46 %% Finaliza la comunicación
47 fclose(Pso);
48 delete(instrfind);
```

Imágenes con HDR

```
1 clear;clc; close all;
2 %%
3 % load('PatronResolucion-6.6um');
4 %%
5 addpath(genpath(pwd)); % Agrega los subfolder al Folder de trabajo
6 delete(instrfind);
7 instrfind
8 Pso=serial('COM3', 'BaudRate', 9600);
9 get(Pso)
10 fopen(Pso);
11 pause(2);
12 instrfind
13 vid=videoinput('pixelinkimaq'); %Para PIXELINK
14 pause(0.1);
15 %%
16 src=getselectedsource(vid);
17 set(src, 'FlipHorizontal', 'on');
18 set(src, 'FlipVertical', 'on');
19 % set(vid, 'ROI', [248,112,256,256]); %[1296,1368,240,240]; %[coordx, coordy, ancho, alto] recorta y cen
20 %% Tiempos de exposición para el patrón de resolución
21 c=0; % Para el patrón de resolución
22 % Las constantes comentadas son para la libélula
23 c1=0;%.025;
24 c2=0;%.05;
25 c3=0;%.125;
26 c4=0;%.2;
```

Código del algoritmo PF implementado.

```

27 c5=0;%.35;
28 % TiempoExposicion=[0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.45];
29 % TiempoExp4=[0.05 0.1 0.15 0.2 0.25 0.45]; % Zona 4 [0 6 48 54]
30 % TiempoExp3=[0.05 0.1 0.125 0.15 0.25 0.3]; % Zona 3 esquinas7
31 % TiempoExp2=[0.01 0.025 0.05 0.1 0.125 0.15]; % Zona 2 esquinas5
32 % TiempoExp1=[0.01 0.025 0.05 0.075 0.1 0.125]; % Zona 1 esquinas3
33 % TiempoExpC=[0.005 0.01 0.025 0.05 0.075 0.1] TE central
34 format long;
35
36 %% Para apple w.m
37 TiempoExposicion=[0.003, 0.0075, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.08, 0.11, 0.15,...
38 0.17, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5];
39 ZC=27;
40 Z1=[18 19 20 26 28 34 35 36];
41 Z2=[9:13 17 21 25 29 33 37 41:45];
42 Z3=[1:5 8 14 16 22 24 30 32 38 40 46 49:53];
43 Z4=[0 6 48 54];
44 All=[ZC Z1 Z2 Z3 Z4];
45
46 %% ZONAS Para apple w.m
47 LEDs={ZC, ZC, [ZC Z1], [ZC Z1], [ZC Z1 Z2], [ZC, Z2, Z1], [Z1, Z2, Z3], Z2, [Z1,Z2,Z4],..
48 [Z2 Z3], [Z2 Z4], Z3, Z3, Z4, [Z3,Z4], Z3, [Z3,Z4], Z4, Z4};
49 %% ZONAS Para PR
50 % LEDs={ZC, [ZC Z1 Z2], [ZC Z1 Z2], All, [ZC Z1], All, [Z1 Z2 Z3], [Z2 Z3 Z4],...
51 [Z3 Z4], [Z3 Z4], Z3, Z4};
52
53 %% ZONAS Para libelula
54 % LEDs={ZC,[ZC Z1], All, [ZC Z1 Z2 Z3], [ZC Z1 Z2], [Z1 Z2 Z3 Z4], All, [Z2,Z3], [Z3 Z4],...
55 Z4, Z4, Z4};
56
57 im_LowRes=cell(55,6);
58 matriz_TE=zeros(55,6);
59 tic
60 for i=1:1:size(TiempoExposicion,2)
61     set(src, 'Exposure',TiempoExposicion(i));
62     % disp(TiempoExposicion(i));
63     aux=LEDs{1,i};
64     for j=1:size(LEDs{1,i},2)
65         ledRGBctrl(Pso,aux(j),255,0,0,200); %Enciende el LED
66         for pos=1:6
67             if isempty(im_LowRes{aux(j)+1,pos})
68                 im_LowRes{aux(j)+1,pos}=getsnapshot(vid);
69                 matriz_TE(aux(j)+1,pos)=TiempoExposicion(i);
70                 pause(1);
71                 break
72             end
73         end
74         ledRGBctrl(Pso,aux(j),0,0,0,0); %Apaga el LED
75     end
76 end
77 end
78 toc

```

Código del algoritmo PF implementado.

```
79  %% Se crean las imágenes HDR.
80  imagenes=[1:7 9:15 17:23 25:31 33:39 41:47 49:55];
81  for LED=25
82  figure(imagenes(1,LED));montage(im_LowRes(imagenes(1,LED),:));
83  title(['HDR LED=' num2str(imagenes(1,LED))]);
84  % figure(2);montage(HDRLED2);title(['HDR LED2=' num2str(LED2)]);
85  end
86  %% Se realiza el HDR para cada 1 de las 49 imágenes
87  hdr_Led=cell(1,49);
88  for LED=1:size(imagenes,2)
89      for i=1:6
90          hdr_Led{1,LED}=
91          makehdr(im_LowRes(imagenes(1,LED),:),'RelativeExposure', matriz_TE(i,:)./matriz_TE(1,1));
92          end
93      end
94  %% Se visualiza la imagen con HDR
95  figure();
96  for i=1:49
97      subplot(7,7,i); imshow(hdr_Led{1,i},[]);title(['HDR LED1=' num2str(i)]);
98  end
99  %%
100  prompt = "¿Qué muestra estás observando? ";
101  archivo = input(prompt);
102  %%
103  save([pwd, '\Datos\HDR\',archivo, '.mat'], 'hdr_Led', 'im_LowRes', 'LEDs' );
104
105  %% Finaliza la comunicación
106  fclose(Pso);
107  delete(instrfind);
```

Bibliografía

- [1] SHECHTMAN, Y., ELDAR, Y. C., COHEN, O., CHAPMAN, H. N., MIAO, J., & SEGEV, M., *Phase retrieval with application to optical imaging.*, En arXiv [cs.IT]. 2014. <http://arxiv.org/abs/1402.7350>
- [2] A. CORDERO DÁVILA, A. CORNEJO, G. RODRIGUEZ ZURITA, R. DÍAZ URIBE., *VI Curso de microscopía óptica*, 2003.
- [3] ZHENG, G., HORSTMAYER, R., & YANG, C., *Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy.*, Nature Photonics. 2013. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2013.187>
- [4] HAWKES, P. W., & SPENCE, *Springer handbook of microscopy*, (1a ed.). Springer Nature, San Francisco, 2019.
- [5] G. ZHENG, *Fourier Ptychographic Imaging: A Matlab Tutorial.*, Morgan & Claypool. 2016.
- [6] BIAN, Z., JIANG, S., SONG, P., ZHANG, H., HOVEIDA, P., HOSHINO, K., & ZHENG, G., *Ptychographic modulation engine: a low-cost DIY microscope add-on for coherent super-resolution imaging.*, Journal of physics D: Applied physics, 53(1), 014005. 2020. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab489d>
- [7] JIANG, S., SONG, P., WANG, T., YANG, L., WANG, R., GUO, C., FENG, B., MAIDEN, A., & ZHENG, G., *Spatial- and Fourier-domain ptychography for high-throughput bio-imaging.*, Nature Protocols, 18(7), 2051–2083. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41596-023-00829-4>
- [8] HEGERL, R., & HOPPE, W., *Dynamische Theorie der Kristallstrukturanalyse durch Elektronenbeugung im inhomogenen Primärstrahlwellenfeld.*, Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie, 74(11), 1148–1154. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19700741112>
- [9] HECHT, E., *Optica*, (3 edición.). Pearson Educacion, 2000. Capítulo 5, pp 219.
- [10] HECHT, E., *Optica*, (5ta edición.). Pearson Educacion, 2017. Capítulo 10, pp 480.
- [11] HECHT, E., *Optica*, (5ta edición.). Pearson Educacion, 2017. Capítulo 4, pp 107.
- [12] BENNETT, A. H., AND OTHERS., *Phase microscopy; principles and applications*, (1st edición.). John Wiley & Sons, Inc., 1951.
- [13] J. MIAO, P. CHARALAMBOUS, J. KIRZ, y D. SAYRE, *Extending the methodology of x-ray crystallography to allow imaging of micrometresized non-crystalline specimens*, Nature, vol. 400, no. 6742, 1999.
- [14] SOMMERFELD, A. *Optics., volume IV of Lectures on Theoretical Physics.*, Academic Pres, Inc., New York, 1954.
- [15] GOODMAN, J. W. *Introduction to Fourier optics.*, W.H. Freeman., 2022.

- [16] HECHT, E., *Optica*, (5ta edicion.). Pearson Educacion, 2017. Capítulo 9, pp 390-392.
- [17] HECHT, E., *Optica*, (5ta edicion.). Pearson Educacion, 2017. Capítulo 13, pp 630-631.
- [18] HECHT, E., *Optica*, (5ta edicion.). Pearson Educacion, 2017. Capítulo 7, pp 313.
- [19] CABRERA, A. Y., *Recuperación de amplitud y fase de un objeto mediante pticografía de Fourier.*, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2022.
- [20] WIKIPEDIA CONTRIBUTORS., *Active-pixel sensor*. *Wikipedia, The Free Encyclopedia.*, https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Active-pixel_sensor&oldid=1233065562, 15 julio de 2024.
- [21] (S/F), *Conversión de datos analógicos a binario (artículo)*. *Khan Academy.*, <https://es.khanacademy.org/computing/ap-computer-science-principles/x2d2f703b37b450a3:digital-information/x2d2f703b37b450a3:from-analog-to-digital-data/a/convertng-analog-data-to-binary>, 15 julio de 2024.
- [22] REINHARD, E., WARD, G., PATTANAİK, S., & DEBEVEC, P., *High dynamic range imaging.*, Morgan Kaufmann. 2008.
- [23] *40 lp/mm, 1"x 3", Float Glass, Ronchi Ruling*, www.edmundoptics.com/p/40-lpmm-1quot-x-3quot-float-glass-ronchi-ruling/4309/\#, 7 de julio de 2024.
- [24] *4X Nikon Achromatic Finite Conjugate Objective*, www.edmundoptics.com/p/4x-nikon-achromatic-finite-conjugate-objective/16597/, 7 de julio de 2024.
- [25] *10X Nikon Achromatic Finite Conjugate Objective*, www.edmundoptics.com/p/10x-nikon-achromatic-finite-conjugate-objective/16598/, 7 de julio de 2024.
- [26] *Discontinued. (s/f)*. *Pixelink.*, <https://pixelink.com/products/industrial-cameras/discontinued/>, 9 de julio de 2024.
- [27] OU, X., HORSTMAYER, R., ZHENG, G., & YANG, C., *High numerical aperture Fourier ptychography: principle, implementation and characterization.*, *Optics Express*, 23(3), 3472. <https://doi.org/10.1364/oe.23.003472>