



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS  
LICENCIATURA EN FÍSICA

# Microscopía sin Lentes

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN FÍSICA

PRESENTA:

JESÚS EDUARDO BRITO CARCAÑO

DIRECTOR: ALBERTO CORDERO DÁVILA

PUEBLA, PUE

AGOSTO 2018





*Dedicado a mi madre Yolanda  
por todo su amor y su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida,  
a mis abuelos, tíos y primas por siempre estar conmigo.*

II

.



*Esta tesis fue apoyada mediante una beca para ayudante de investigador Nivel III Sistema Nacional de Investigadores otorgada por CONACYT gracias al Dr. Alberto Cordero Dávila.*



# Agradecimientos

Al Dr. Alberto Cordero Dávila por compartir su conocimiento para la realización de esta tesis.

Al M.C. José Manuel Rodríguez Luna coordinador de extensión y difusión de la FCQ BUAP. Por aportar las primeras muestras de eritrocitos.

Al Dr. Víctor Manuel Altuzar Aguilar. Por proporcionar las primeras microesferas y su valiosa ayuda en la preparación y dilución de las mismas.

Al Dr. Jorge Castro profesor investigador del INAOE. Por proporcionarnos las microesferas de dióxido de silicio.

A la QFB Ma. del Rosario Cordero Temol y al M.C. Juan Márquez Hernández. Por proporcionarnos las muestras de sangre de Laboratorio Bio-Clínico de Puebla.

Al Dr. Carlos Manuel Carlos Ortiz Lima por su ayuda en la construcción del circuito de alimentación del LED del microscopio.

Al C. Noé Cuautle Tépo por las horas de trabajo en el taller mecánico.



# Resumen

Esta tesis lleva como nombre Microscopía sin Lentes. Los objetivos principales de este trabajo son mostrar la construcción finalizada de un microscopio el cual no utiliza lentes, mostrar una aplicación directa de nuestro sistema la cual es el uso del microscopio en análisis clínicos, en particular nos concentraremos en la determinación del tamaño de eritrocitos así como la sombra de los mismos y finalmente se mostrara todo el trabajo interdisciplinario que conlleva todo el trabajo.

Mediante el uso de las técnicas de difracción y la producción en masa de los detectores tales como CMOS o CCD ha sido posible construir un microscopio sin lentes a un costo muy bajo.

El proyecto titulado “Microscopía Holográfica Digital sin Lentes” constó de dos etapas: La primera parte del proyecto consistió en la construcción del instrumento utilizando: un LED que funciona como la fuente de iluminación; un pinhole hecho con papel aluminio y un detector CMOS. Podemos hacer énfasis en algunas de las características y ventajas que podemos encontrar entre un microscopio sin lentes ante uno convencional, en primer lugar encontramos la facilidad de construcción del sistema además de omitir la aplicación de la teoría de aberraciones que aunque hoy en día es bien conocida y se puede aplicar a todo sistema óptico es una gran ventaja evadir tal teoría. Otra de las ventajas que podremos observar a lo largo del trabajo es la existencia de un gran campo de visión (CDV). Cabe mencionar también que existen diferentes configuraciones de microscopios sin lentes por ejemplo,

aquellos que se valen de un láser como fuente de iluminación, no obstante en nuestro caso como ya mencionamos utilizaremos una configuración diferente en la que utilizaremos un LED como fuente de iluminación y esto conlleva a un sistema de bajo costo de construcción.

El microscopio ya puede utilizarse para observar patrones de difracción de los objetos a escala micrométrica y si los objetos son circulares podemos determinar sus tamaños. La segunda parte del proyecto se enfocó en observar diversas muestras, en particular se trabajó con eritrocitos y se caracterizaron. Para esto se desarrolló un algoritmo que sirvió para simular los patrones de difracción generados por células de distintos diámetros, la célula se simuló como un objeto circular; no obstante, también es posible simular objetos cuadrados o elipsoidales. Una vez que se tienen los patrones de difracción ya simulados, podemos determinar el tamaño del objeto. En paralelo, se trabajó de manera experimental y se pudieron obtener los patrones de difracción de los eritrocitos; una vez que tenemos ambos podemos cotejar los tamaños y así determinar las dimensiones de la célula que genera el patrón de difracción obtenido experimentalmente. Asimismo, este trabajo ha servido para crear las bases de microscopía sin lentes en nuestro laboratorio ya que el proyecto sigue abierto para posibles líneas como lo es la reconstrucción de la amplitud y fase.

Palabras clave: Microscopía sin Lentes, Holografía, Detección de Eritrocitos, Difracción, Patrones de Difracción.

# Índice general

|                                                   |      |
|---------------------------------------------------|------|
| <b>Agradecimientos</b>                            | V    |
| <b>Resumen</b> . . . . .                          | VII  |
| <b>Lista de figuras</b>                           | XIII |
| <b>1. Introducción</b>                            | 1    |
| 1.1. Microscopía Convencional . . . . .           | 1    |
| 1.2. Holografía . . . . .                         | 3    |
| 1.3. Holografía sin Lentes . . . . .              | 5    |
| <b>2. Construcción del Microscopio sin Lentes</b> | 15   |
| 2.1. El detector . . . . .                        | 15   |
| 2.1.1. Tamaño del pixel del detector . . . . .    | 17   |
| 2.2. La fuente de iluminación . . . . .           | 19   |
| 2.2.1. El diodo LED . . . . .                     | 20   |
| 2.2.1.1. Curva característica corriente/tensión   | 20   |
| 2.2.2. Construcción del circuito . . . . .        | 21   |
| 2.2.2.1. Órdenes de Magnitud . . . . .            | 22   |
| 2.2.2.2. El diodo en polarización inversa:        |      |
| ruptura . . . . .                                 | 22   |
| 2.2.2.3. Espectro de emisión del LED . . . . .    | 23   |
| 2.2.2.4. Tratamiento adicional del LED . . . . .  | 24   |
| 2.3. El Pinhole . . . . .                         | 26   |
| 2.3.1. La coherencia del sistema . . . . .        | 27   |
| 2.4. Construcción del soporte . . . . .           | 28   |

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5. Segunda Versión del Microscopio sin Lentes . . . . .                          | 30        |
| <b>3. Errores y Pruebas</b>                                                        | <b>35</b> |
| 3.1. La Primera Muestra . . . . .                                                  | 35        |
| 3.2. Pantallas de celulares . . . . .                                              | 36        |
| 3.3. Rejillas de Bironchi . . . . .                                                | 38        |
| 3.4. Primeras Muestras de Sangre . . . . .                                         | 39        |
| 3.5. Trabajando con Parásitos . . . . .                                            | 41        |
| 3.6. Primeras Microesferas . . . . .                                               | 43        |
| <b>4. Aislamiento de Células</b>                                                   | <b>47</b> |
| 4.1. ¿Por qué aislar las células? . . . . .                                        | 47        |
| 4.2. Propuestas para realizar el aislamiento de células . . . . .                  | 49        |
| 4.2.1. Papel adherible sobre el portaobjetos . . . . .                             | 49        |
| 4.2.2. Acotar una parte de la muestra . . . . .                                    | 50        |
| 4.2.3. Cortar el portaobjetos antes de colocar la muestra . . . . .                | 51        |
| 4.2.4. Dilución de una muestra de sangre . . . . .                                 | 52        |
| <b>5. Programas de Cómputo Utilizados</b>                                          | <b>57</b> |
| 5.1. Programa para Generar Patrones de Difracción . . . . .                        | 57        |
| 5.1.1. Determinación del diámetro de los Patrones de Difracción . . . . .          | 60        |
| 5.2. Determinación Experimental del Tamaño de los Patrones de Difracción . . . . . | 61        |
| 5.3. Programa para Determinar el tamaño de la Célula a través del Patrón . . . . . | 63        |
| <b>6. Resultados</b>                                                               | <b>67</b> |
| 6.1. Resultados de Simulación Similares . . . . .                                  | 67        |
| 6.2. Rejillas de Prueba de Ronchi . . . . .                                        | 70        |
| 6.3. Calibración con microesferas de $SiO_2$ . . . . .                             | 72        |
| 6.4. Eritrocitos Diluidos . . . . .                                                | 75        |
| 6.5. Eritrocitos sin Diluir . . . . .                                              | 76        |



|                                                        |            |
|--------------------------------------------------------|------------|
| <i>ÍNDICE GENERAL</i>                                  | XI         |
| 6.6. Eritrocitos diluidos cinco veces . . . . .        | 78         |
| <b>7. Conclusiones</b>                                 | <b>83</b>  |
| <b>A. El Microscopio Óptico</b>                        | <b>87</b>  |
| A.1. El Microscopio óptico Simple . . . . .            | 87         |
| A.2. Oculares . . . . .                                | 89         |
| A.3. Microscopio Óptico Compuesto . . . . .            | 92         |
| <b>B. Antecedentes de la Holografía</b>                | <b>95</b>  |
| <b>C. Holografía Contemporánea</b>                     | <b>99</b>  |
| <b>D. Códigos de Programación</b>                      | <b>103</b> |
| D.1. Programa par Generar Patrones de Difracción . . . | 103        |
| D.2. Programa para determinar el tamaño de la célula . | 106        |



# Índice de figuras

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Microscopio tradicional . . . . .                                                                                                    | 2  |
| 1.2. Arreglo experimental general de un sistema forma-<br>dor de imágenes sin lentes cuyo detector puede ser<br>un CMOS o un CCD. . . . . | 7  |
| 1.3. La formación de imágenes sin lentes otorga un cam-<br>po de visión grande y simultáneamente una alta<br>resolución. [3] . . . . .    | 8  |
| 1.4. Panorama general del microscopio sin lentes . . . .                                                                                  | 14 |
| 2.1. a) cámara web usada, b) detector . . . . .                                                                                           | 16 |
| 2.2. Configuración de un detector, $d$ será la distancia de<br>separación entre los centros. . . . .                                      | 18 |
| 2.3. Esquema del arreglo experimental. . . . .                                                                                            | 18 |
| 2.4. Haz reflejándose en el detector. . . . .                                                                                             | 18 |
| 2.5. Patrón generado por el detector. . . . .                                                                                             | 19 |
| 2.6. Símbolo de un diodo . . . . .                                                                                                        | 20 |
| 2.7. Curva característica . . . . .                                                                                                       | 21 |
| 2.8. Circuito usado para el LED . . . . .                                                                                                 | 22 |
| 2.9. Circuito armado . . . . .                                                                                                            | 22 |
| 2.10. Espectro lámpara de neón y del LED usado . . . .                                                                                    | 24 |
| 2.11. LED . . . . .                                                                                                                       | 26 |
| 2.12. LED lijado y Pulido . . . . .                                                                                                       | 26 |
| 2.13. La técnica de las agujas para construcción de pinholes                                                                              | 27 |
| 2.14. Esquema de la coherencia en nuestro sistema . . .                                                                                   | 28 |
| 2.15. Estructura del Microscopio . . . . .                                                                                                | 29 |

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.16. Microscopio primera versión . . . . .                                                             | 30 |
| 2.17. Primer tubo el cual sostiene al detector CMOS . . .                                               | 31 |
| 2.18. Segundo tubo: acoplador del sistema. . . . .                                                      | 32 |
| 2.19. Estructura del Microscopio . . . . .                                                              | 33 |
| 2.20. Microscopio sin lentes V2.0 . . . . .                                                             | 33 |
| 3.1. Corte transversal de apio . . . . .                                                                | 36 |
| 3.2. Pantalla celular vista con microscopio sin lentes . .                                              | 37 |
| 3.3. Patrones de Difracción de una rejilla bironchi . . .                                               | 38 |
| 3.4. Muestra de sangre preparada . . . . .                                                              | 39 |
| 3.5. Muestra de sangre preparada vista de perfil . . . .                                                | 39 |
| 3.6. Células vistas en microscopio óptico 40x . . . . .                                                 | 40 |
| 3.7. Células vistas en microscopio sin lentes . . . . .                                                 | 40 |
| 3.8. Células vistas en microscopio sin lentes . . . . .                                                 | 41 |
| 3.9. Parásitos vistos con el microscopio sin lentes . . .                                               | 43 |
| 3.10. Comparación patrones . . . . .                                                                    | 44 |
| 3.11. Microesferas vistas en el microscopio sin lentes . .                                              | 45 |
| 4.1. Eritrocitos vistos en el microscopio óptico . . . . .                                              | 48 |
| 4.2. Eritrocitos vistos en el microscopio sin lentes . . .                                              | 49 |
| 4.3. Primer intento de aislar células . . . . .                                                         | 49 |
| 4.4. Primer intento de aislar células . . . . .                                                         | 50 |
| 4.5. Patrón de difracción de la cinta . . . . .                                                         | 51 |
| 4.6. Patrón de difracción de restos de sal. . . . .                                                     | 55 |
| 5.1. Geometría de la Difracción . . . . .                                                               | 59 |
| 5.2. Patrón de difracción simulado por una célula de 4<br>micras y $z_{ccd} = 470\mu m$ . . . . .       | 60 |
| 5.3. Patrón de difracción simulado por una célula de 4<br>micras y $z_{ccd} = 100\mu m$ . . . . .       | 60 |
| 5.4. Arriba patrón de difracción simulado. Abajo perfil<br>de Irradiancia con un corte al 10% . . . . . | 61 |
| 5.5. Foto de una Muestra . . . . .                                                                      | 62 |
| 5.6. Patrón Recortado . . . . .                                                                         | 62 |

|                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.7. Perfil de Irradiancia de un patrón con un corte al 10 % . . . . .                                                                                                                                                                     | 63 |
| 5.8. Aproximación mediante rectas para determinar tamaño de las células . . . . .                                                                                                                                                          | 64 |
| 6.1. Comparación de resultados reportados por Ozcan[10] y resultados simulados para esta tesis. . . . .                                                                                                                                    | 69 |
| 6.2. Patrones de difracción de microesferas de dióxido de silicio . . . . .                                                                                                                                                                | 73 |
| 6.3. Muestra de Eritrocitos Diluidos . . . . .                                                                                                                                                                                             | 75 |
| 6.4. Muestra de Eritrocitos sin Diluir . . . . .                                                                                                                                                                                           | 77 |
| 6.5. Histograma del tamaño de células sin diluir . . . . .                                                                                                                                                                                 | 78 |
| 6.6. Eritrocitos Diluidos cinco veces 1:100000 . . . . .                                                                                                                                                                                   | 79 |
| 6.7. Histograma células diluidas cinco veces . . . . .                                                                                                                                                                                     | 80 |
| A.1. Microscopio Simple . . . . .                                                                                                                                                                                                          | 88 |
| A.2. Ojo sin lente . . . . .                                                                                                                                                                                                               | 88 |
| A.3. Ojo con lente . . . . .                                                                                                                                                                                                               | 88 |
| A.4. Ocular de Huygens . . . . .                                                                                                                                                                                                           | 90 |
| A.5. Ocular de Ramsden . . . . .                                                                                                                                                                                                           | 91 |
| A.6. Ocular de Kelner . . . . .                                                                                                                                                                                                            | 91 |
| A.7. Ocular de Erfle . . . . .                                                                                                                                                                                                             | 92 |
| A.8. Microscopio Compuesto . . . . .                                                                                                                                                                                                       | 92 |
| B.1. Interferencia entre una onda de iluminación homogénea y la segunda onda emitida por un objeto pequeño. . . . .                                                                                                                        | 96 |
| B.2. (a) Micrografía original. (b) Micrografía directamente fotografiada a través del mismo sistema óptico usado para la reconstrucción. (c) Diagrama de interferencia. (d) Reconstrucción del objeto original usando el diagrama. . . . . | 97 |
| C.1. Detección Interferométrica. . . . .                                                                                                                                                                                                   | 99 |

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| C.2. Frente de onda reconstruido con la onda de referen- |     |
| cia original $A$ como iluminación. . . . .               | 101 |
| C.3. Frente de onda reconstruido con la onda de referen- |     |
| cia conjugada $A^*$ como iluminación. . . . .            | 102 |

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Microscopía Convencional

En la microscopía óptica de alta resolución tradicionalmente se usan lentes objetivo de alta amplificación y apertura numérica grande. Por otro lado, la microscopía sin lentes puede proveer imágenes de alta resolución sin el uso de lentes que sirvan para enfocar, ofreciendo las ventajas de un campo de visión grande, alta resolución, bajo costo, portabilidad y una formación tridimensional de imágenes con profundidad.

Históricamente, la formación de imágenes de elementos biológicos a escala microscópica ha sido realizada usando lentes, normalmente con un microscopio compuesto y sus adaptaciones (ver figura [1.1](#))



Figura 1.1: Microscopio tradicional

Por décadas la microscopía óptica ha sido la pionera de varios campos incluyendo ingeniería, ciencias físicas, biología y medicina. A pesar de su larga historia, no ha habido un cambio significativo en el diseño y los principios de trabajo en los microscopios ópticos. Durante la última década, motivados por entender mejor el nano-mundo, en la microscopía óptica surgieron técnicas de súper-resolución y todo comenzó al abordar algunas de las limitaciones fundamentales de la imagenología óptica tales como el límite de difracción. A pesar de las técnicas de súper-resolución, muchas otras arquitecturas novedosas de producción de imágenes fueron también implementadas para mejorar el estado del arte en la microscopía como son mejor velocidad, evitar señales de ruido, contraste, rendimiento, precisión, etc. Este progreso reciente en microscopía utiliza varias tecnologías innovadoras para superar las barreras fundamentales en imagenología y ha creado emoción en diversos campos que permite que se hagan nuevos descubri-



mientos. No obstante, junto con este progreso, la complejidad y el costo de la plataforma de formación de imágenes se ha incrementado conforme se amplían los usos de algunas técnicas avanzadas más allá de laboratorios bien equipados. Para concluir podemos afirmar que, en efecto, ya existen avances importantes tanto en la microscopía convencional como en la microscopía sin lentes, no obstante, al hablar de avances en la microscopía óptica convencional implícitamente estamos hablando de altos costos de producción de la instrumentación y he ahí donde hallamos la ventaja de nuestro sistema. Finalmente, es importante aclarar que a nuestro sistema lo podemos llamar un Microscopio Holográfico Digital sin Lentes (MHD-L) ya que la sombra que se genera con el microscopio puede ser interpretada como un patrón de difracción o como un holograma [1].

## 1.2. Holografía

Hemos experimentado un rápido avance en tecnologías digitales con detectores de estado sólido 2D mucho más baratos, teniendo áreas significativamente más grandes con píxeles más pequeños, mejores rangos dinámicos, marcos de referencia y rangos de ruido; así como mucho más rápidos, baratos, así como memorias y procesadores digitales más poderosos. Esta revolución digital continúa, cuando se combina con teorías avanzadas de formación de imágenes y algoritmos numéricos. También crea una oportunidad en la imagenología y microscopía óptica para enfrentar otra dimensión en el renacimiento dirigido hacia la simplificación de aparatos ópticos de formación de imágenes, haciéndolos significativamente más compactos, de bajo costo y sencillos de usar, sin perjudicar potencialmente su rendimiento. La formación de imágenes sin lentes usando holografía digital se puede considerar que es la base de una nueva oportunidad y cuando se combine con un arreglo avanzado y la electrónica digital de bajo costo, puede ofrecer una solución

para algunas de las necesidades de la biología celular y en diagnósticos médicos especialmente en entornos de recursos limitados.

Durante la década pasada, varios arreglos de formación de imágenes sin lentes se dieron a conocer. Entre estos enfoques, la holografía digital sin lentes merece atención especial ya que, con los nuevos algoritmos computacionales y modelos matemáticos, ésta tiene el potencial de sacar el mayor beneficio de esta revolución digital que hemos estado experimentando. En este contexto, la holografía digital sin lentes ya se ha demostrado exitosamente para microscopía de alta resolución de células y otros microorganismos.

La holografía es una técnica de formación de imágenes en dos pasos que permite recuperar la amplitud y la fase del frente de una onda llamada objeto. En un primer paso, denominado registro, se almacena el patrón de interferencia entre la onda objeto y una onda de referencia de la cual se conoce su amplitud y fase. A partir de este registro de intensidad, denominado holograma, se puede recuperar la amplitud compleja de la onda objeto en la segunda etapa de la holografía, denominada reconstrucción. En su concepción original de configuración en línea [1], la holografía no fue una técnica con gran acogida debido a las limitaciones que presenta en términos de la superposición de las llamadas imágenes gemelas y orden cero, lo cual dificultaba la observación de la imagen reconstruida. Se inventó entonces una configuración de holografía fuera de eje que alivió dicha superposición e impulsó el uso de la holografía. Mientras que el proceso de registro del holograma se puede simular como una superposición en amplitud de las ondas objeto y referencia, el proceso de reconstrucción se puede entender como la difracción que una onda sufre en el holograma, entendido éste como una red de difracción. Este entendimiento unido a la posibilidad de la manipulación digital de la información del holograma registrado abrió un nuevo espectro de oportunidades para la holografía y marcó la génesis de lo que hoy se conoce como holografía digital de la cual se reconoce su consolidación a media-

dos de los noventas. El mundo digital permitió la visualización y cuantificación de la amplitud y la fase de la onda reconstruida y dotó la holografía de un conjunto nuevo de herramientas lo que significó un conjunto adicional de posibilidades por la versatilidad que brinda el mundo digital. Por ejemplo, fue posible remover las limitaciones que hacían la arquitectura en línea de Gabor una configuración poco atractiva, reviviendo el interés en esta simple, pero robusta arquitectura. [2]

### 1.3. Holografía sin Lentes

La holografía coherente sin lentes convencional demanda una coherencia espacial casi perfecta para iluminación y por lo tanto requiere enfocarse sobre una pequeña apertura que está en el orden de una longitud de onda para el filtrado espacial. El uso de una apertura de tamaño pequeño ( $12\mu m$ ) requiere un sistema mecánico estable, así como una alineación cuidadosa, junto con una lente de enfoque para asociar eficientemente la radiación láser a la apertura para mejorar el flujo máximo de la luz. En resumen, mantener una apertura pequeña limpia y operacional por un periodo de tiempo largo puede ser otro reto. Asimismo, las células de interés normalmente se posicionan muy lejos ( $\approx 1cm$ ) de la superficie del sensor, tal que el rastro holográfico de cada célula se esparce casi sobre toda el área del sensor, donde todos los rastros de las células se superponen. Tal enfoque desafortunadamente limita el Campo de Visión (CDV) para la formación de la imagen en el plano del detector. Todos estos requerimientos no sólo incrementan relativamente el costo y el tamaño del instrumento óptico, sino que también hacen que la holografía coherente sin lentes sea un tanto inconveniente para usarse en configuraciones de recursos limitados. Estas técnicas de formación de imágenes basadas en holografía no utilizan circuitos integrados como las que utilizan varios arreglos aparatosos y por lo tanto se pueden consi-

derar bajo la misma categoría como las modalidades avanzadas de formación de imágenes discutidas en la introducción haciéndolas mucho menos adecuadas. Además, estos estudios usaron óptica acoplada para la iluminación como es la lente objetivo de un microscopio (junto con un pequeño pinhole de tamaño  $\approx 1$  a  $5\mu m$  o  $10\mu m$ ) y tiene relativamente un buen rendimiento de formación de imágenes, entiéndase por buen rendimiento como una formación de imágenes de buena resolución.

Para ofrecer una solución alternativa a la formación de imágenes sin lentes dirigido a aplicaciones en telemedicina. aquí ilustramos un microscopio holográfico incoherente que logra una resolución de  $\approx 1$  a  $2\mu m$  (lo suficiente para formar la imagen de estructuras subcelulares en una gota de sangre) sobre un campo de visión largo de  $\approx 24mm^2$ , el cual constituye un pliegue  $\approx 10$  veces aún mejor comparado con un campo de visión típico de una lente objetivo 10x (ver Figura 1.2). Este microscopio holográfico no utiliza lente alguna, láseres o componentes opto/mecánicos aparatosos, lo cual simplifica en gran medida su arquitectura, haciéndolo compacto, liviano, y de bajo costo.

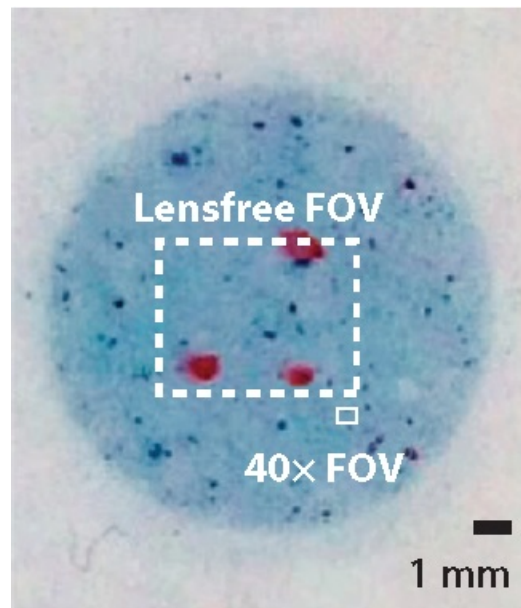


Figura 1.2: Arreglo experimental general de un sistema formador de imágenes sin lentes cuyo detector puede ser un CMOS o un CCD.

Recientemente, la formación de imágenes sin lentes se ha desarrollado lo suficiente como una modalidad competitiva frente a un microscopio tradicional a base de lentes. En microscopía sin lentes un patrón de difracción que emerge de un objeto (basándose, por ejemplo, en esparcimiento o fluorescencia) es grabado directamente en un sensor digital sin formar la imagen ópticamente o amplificarla con la ayuda de lentes (ver figura 1.3).

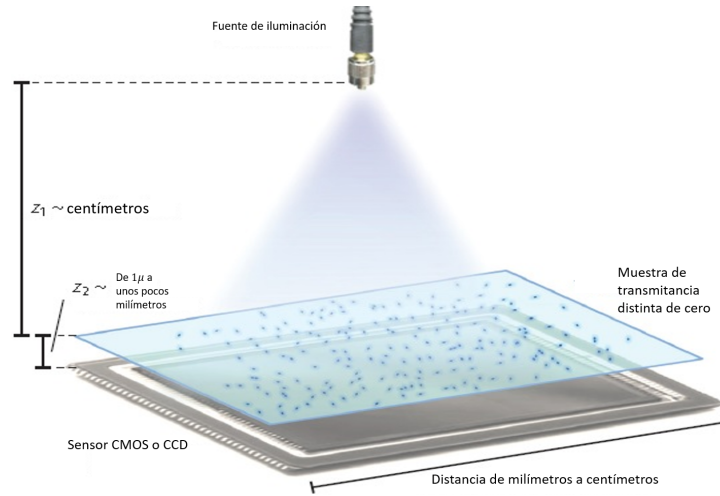


Figura 1.3: La formación de imágenes sin lentes otorga un campo de visión grande y simultáneamente una alta resolución. [3]

Este patrón de difracción grabado es entonces reconstruido computacionalmente para formar una “imagen” del objeto. El reciente desarrollo de la formación de imágenes sin usar lentes fue posible en gran medida gracias a la producción en masa de detectores de bajo costo que tiene un tamaño de pixel pequeño y una gran densidad de pixeles, junto con mejoras computacionales y algoritmos de reconstrucción usados para procesar los patrones de difracción capturados. En esta tesis revisaremos la construcción de un sistema que se considera un microscopio sin lentes ya que es un sistema formador de imágenes y además veremos su rango de aplicación en la citometría. En comparación con la microscopía convencional a base de lentes, los enfoques de no usar lentes otorgan varias ventajas claves: un producto con un ancho de banda grande (un campo de visión grande [ver Figura 1.2] y una alta resolución de manera simultánea), bajo costo, portabilidad, y una formación tridimensional de imágenes con buena profundidad. Estas ventajas hacen a la formación de imágenes sin lentes particularmente útil en aplicaciones de análisis que requieren grandes estadísticas. Estas aplicaciones incluyen tareas de diagnóstico complicadas y

difíciles de la citometría tales como muestras de Papanicolau para pruebas de cáncer cervical e inspección de muestras de sangre para el diagnóstico de malaria, el cual se requiere una inspección en alta resolución de un gran número de células. Así, muchas células necesitan ser escaneadas para declarar una muestra como “negativa” y que sea confiable. De manera más general, la formación de imágenes sin lentes, puede ser una buena elección para cualquier tipo de estudio que exija estimaciones estadísticas significativas de poblaciones de células en una muestra. Ejemplos de estos incluyen reconocimiento de miles de trayectorias de espermias para identificar movimientos raros y un conteo completo de rendimiento de la sangre. Estudios diseñados para muestras que tienen una densidad muy alta (concentración) también se benefician del enfoque de formación de imágenes sin lentes con un gran ancho de banda espacial y buena profundidad de campo ya que es posible detectar ya sea pocos objetos o de miles a millones de objetos en una sola imagen. Diagnósticos de la calidad del aire y del agua son dos ejemplos en los que la densidad puede variar rápidamente.

En este mundo en constante desarrollo existen más de 30 millones de personas que están infectadas con VIH. El consejo de inteligencia nacional de los Estados Unidos (NIC) predice que este número alcanzará una cifra de más de 80 millones en los años que están por venir. Por lo tanto, hay una necesidad urgente de herramientas de diagnóstico simples, de bajo costo y desechables que puedan ser implementadas en países que están en desarrollo para incrementar el acceso al cuidado del VIH y mejorar tratamientos que den resultados. Por otro lado, tales tecnologías enfrentan una tarea significativa, que es todo un reto, ya que se requiere el monitoreo o conteo de cientos de miles de objetos microscópicos (e.g células) simultáneamente. Por lo tanto, se necesita una tecnología simple y compacta para el conteo de células, especialmente para problemas relacionados con la salud, tales como el monitoreo de VIH en regiones de recursos limitados. Un objetivo a mediano

plazo del sistema sería desarrollar una plataforma de conteo de linfocitos CD4 T que sea, barata y desechable. Un conteo CD4 de una muestra de sangre que presente menos de 200 células por microlitro establece un diagnóstico clínico de SIDA [10]. En la mayoría de los entornos, el tratamiento de terapia antirretroviral (ART) se inicia ya que los pacientes están en riesgo de infecciones.

Hay dos problemas significativos que necesitan ser abordados a fin de contar los linfocitos CD4 T en una muestra de sangre usando tecnología de punta: (1) capturar/aislar células de una muestra de sangre en una manera eficiente y (2) hacer un conteo rápido de estas células aisladas/capturadas. El primer problema es abordado de tal modo que las células son etiquetadas por microfluidos fluorescentes basados en técnicas que no abordaremos en este trabajo. El tema de este trabajo, sin embargo, provee el primer paso experimental de una solución "on-chip" para el segundo problema del conteo rápido de las células capturadas/aisladas, entendiéndose "on-chip" como el uso de elementos (detectores) que cuentan con un circuito integrado y que ya poseen una interfaz previamente desarrollada para poder interactuar fácilmente con un ordenador, tal es el caso de un CMOS o un CCD.

Se han realizado estudios recientes abordando los dos problemas antes mencionados del conteo de células. Por ejemplo, fue propuesto un enfoque de larga escala fluidica, donde todos los glóbulos blancos son capturados en un filtro de policarbonato. Este aislamiento inicial de células no es selectivamente específico hacia los linfocitos CD4 T. Este método captura todos los glóbulos blancos en un filtro poroso. Por lo tanto, un paso adicional, e.g, un proceso de etiquetamiento fluorescente es utilizado para distinguir los linfocitos CD4 T de otras células que también son capturadas por el filtro mecánico. Los linfocitos CD4 T son entonces contados bajo un microscopio fluorescente usando técnicas de reconocimiento automatizado de imágenes. Este proceso sufre por el preprocesamiento que se requiere y el tiempo consumido



durante el etiquetamiento de la muestra de sangre con el líquido fluorescente. Además, el método de conteo requiere capturar imágenes en múltiples ubicaciones sobre el largo filtro mecánico usando un microscopio fluorescente. Un conteo promedio usando estas múltiples imágenes microscópicas es dado como el valor de conteo final. Estos problemas hacen al etiquetamiento fluorescente para el conteo de células una técnica menos atractiva para las aplicaciones. Recientemente, las tecnologías para el conteo de células CD4 sin etiquetarlas han sido también introducidas. Estos enfoques libres de etiquetas utilizaron canales microfluídicos para capturar células al usar superficies químicas con una alta especificidad y eficiencia para capturar. Sin embargo, en estas técnicas de conteo de células sin usar etiquetas, el conteo es aún realizado bajo un microscopio regular y toma horas cuantificar la captura en un solo aparato. Esto crea un reto significativo para lograr un dispositivo de respuesta rápida. Además la captura/aislamiento de células CD4 sin etiqueta puede ser logrado con el enfoque discutido anteriormente usando una superficie química.

Un enfoque propuesto para resolver el segundo problema es usar espectroscopía eléctrica para cuantificar las células capturadas/aisladas en un canal microfluídico al monitorear los cambios en la conductividad al capturar células lisiadas. No obstante, este tiene problemas para llegar a ser un método estándar de conteo de células debido al hecho de que las células capturadas de cada paciente pueden tener variaciones iónicas en las concentraciones. Esto podría conducir a errores dinámicos significativos entre pacientes como el número incrementado de células capturadas. Además, una muestra de sangre es un medio conductor iónico. Tal enfoque basado en la impedancia tiene que iniciar reemplazando la muestra de sangre en los canales microfluídicos con una solución no iónica, manteniendo en ese lugar las células intactas. Entonces, estas células tienen que ser lisiadas y el cambio de la impedancia resultante debería ser determinado. Por tanto, tal sistema basado

en impedancia tiene que cambiar múltiples soluciones en la presencia de células capturadas en un canal microfluídico. Ya que las células capturadas son degradadas y son propensas a perder iones pues estas soluciones están siendo reemplazadas en un canal, esto podría también ser una fuente de errores para tal enfoque de conteo de células.

Por lo tanto, podemos concluir que el conteo/cuantificación de células capturadas/aisladas aún permanece como un desafío mayor que necesita más atención para el cuidado de VIH, así como de monitorear sus aplicaciones. No obstante, para llegar a lograr este desafío se necesitan elementos que en su momento no teníamos desarrollados, es decir, para llegar al punto en el que se pueda realizar el conteo/cuantificación e incluso a la recuperación de la célula como tal es necesario realizar todo un proceso previo. Para ejemplificar esto podemos mencionar que para llevar a cabo ya sea la reconstrucción o el conteo de células es necesario definir bien el soporte de la célula, con esto nos referimos a que de algún modo es imperativo determinar el tamaño de la o las células con las que estamos trabajando, y he ahí donde podemos observar la utilidad de la presente tesis, ya que sin este trabajo en un futuro no se podría concluir de una manera completa. Para este fin, en esta tesis, describimos un microscopio sin lentes basado en la formación de la imagen de la sombra, el cual se basa en grabar la imagen de la sombra de cada célula (o partícula a escala micrométrica) sobre un sensor optoelectrónico. Este enfoque óptico sin lentes incrementa el campo de visión de un microscopio convencional por al menos dos órdenes de magnitud y permite monitorear cientos de miles de células individuales de diferentes células de población en tiempo real. Por lo tanto, este enfoque podrá en un momento monitorear o contar más de 100 veces el número de células aisladas respecto a un microscopio convencional, simultáneamente dentro de un menor tiempo sin componentes ópticos de precio elevado, tales como objetivos o lentes. El diseño simple también permite la

miniaturización de la tecnología que haría más adecuado su uso en lugares de recursos limitados. En resumen, la tesis presentada se dedicará exclusivamente a la construcción del microscopio y en gran medida a la determinación del tamaño de las células así como la identificación de las mismas, sin embargo el trabajo debe entenderse como las bases para que en el proyecto a seguir se tengan todos los elementos necesarios para la culminación del microscopio holográfico digital sin lentes.

Otras aplicaciones en las que la formación de imágenes sin lentes es en el área de la salud. En un esfuerzo para incrementar la velocidad de los diagnósticos y reducir sus costos es minimizar la dependencia de usar el laboratorio central, estas aplicaciones exigen dispositivos y enfoques que sean compactos, portátiles, que no sean propensos a una mala alineación, baratos y que se pueda llegar producir en masa. La formación de imágenes sin lentes es una buena opción para técnicas aplicadas a la salud porque no requiere lentes objetivos para una mayor precisión los cuales son muy caros o fuentes de iluminación muy sofisticadas. En muchos ejemplos, un diodo LED es suficiente para un buen sistema de iluminación en un sistema formador de imágenes sin lentes, siendo el sensor ya sea CMOS o CCD el único componente caro que se requiere; aun así, el costo de estos detectores es de no más de diez dólares debido a la producción en masa de estos (los podemos encontrar incluso en teléfonos celulares). La formación de imágenes podría ser también compatible con teléfonos celulares o smartphones, y sería una opción más adecuada para un sistema portátil para el uso de diagnósticos en campo abierto.

Citando al artículo de Ozcan [10] " Nuestro sistema no se enfoca en lograr una gran resolución espacial, sólo necesitamos que las células que se encuentren dentro del campo de visión puedan producir un contraste suficiente y evitar en lo que se pueda el ruido para así observar las células de forma individual..."podemos concluir que no es necesaria una gran resolución ya sea angular o

transversal ya que lo único que se requiere es identificar la diferencia entre dos o más patrones de difracción en una misma foto, La figura 1.4 muestra una versión muy simplificada de lo que es nuestro arreglo para detectar células. Las células son puestas entre dos portaobjetos y el sensor yace justo abajo del último portaobjetos. A fin de probar la viabilidad de este enfoque, las células fueron analizadas con un microscopio convencional después de colocarlas entre los portaobjetos y en el microscopio nos aseguramos de que no hubiera deformación en las células. En esta configuración, usamos un LED como fuente de luz.

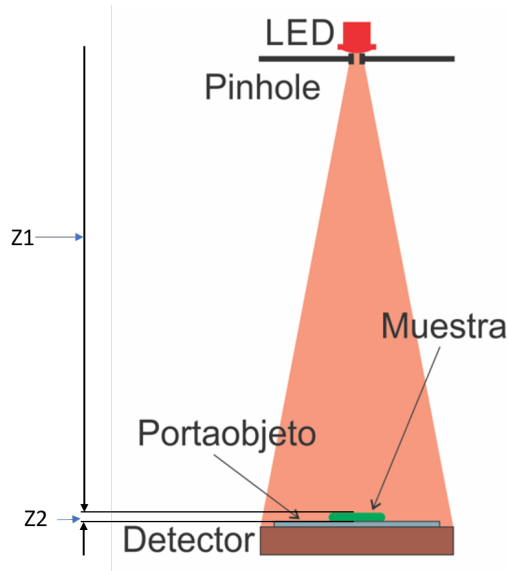


Figura 1.4: Panorama general del microscopio sin lentes

## Capítulo 2

# Construcción del Microscopio sin Lentes

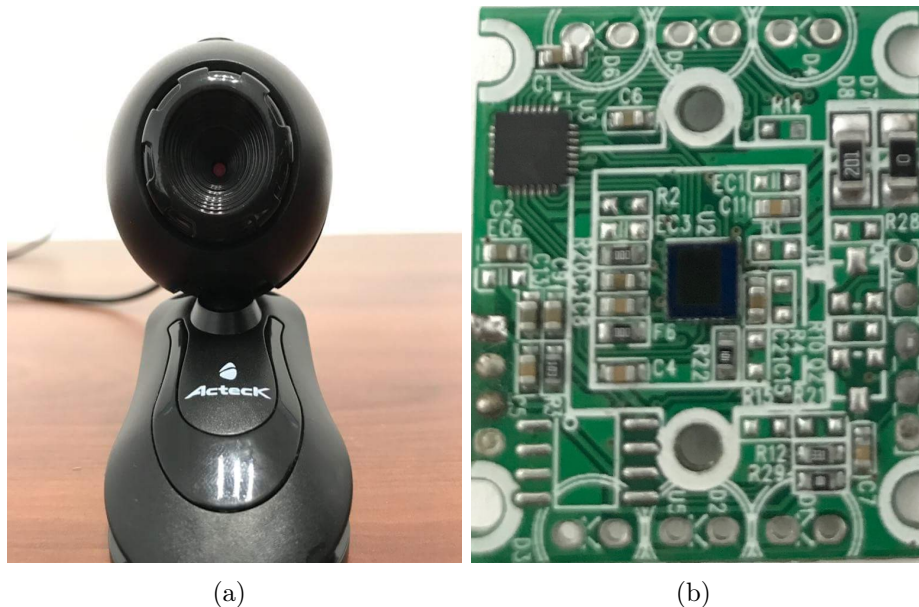
### 2.1. El detector

Siguiendo a Ozcan [4] usamos un sensor CMOS (Complementary metal-oxide-semiconductor) por la tecnología usada para la construcción de circuitos integrados. La tecnología CMOS es usada en microprocesadores, microcontroladores, otros circuitos lógicos digitales; la tecnología CMOS es también usada para varios circuitos análogos tales como sensores de formación de imágenes (sensor CMOS de pixeles activos). Un sensor de imágenes es un dispositivo que detecta y transmite la información que constituye una imagen, esto lo hace mediante la conversión de ondas electromagnéticas en señales, tales sensores los podemos encontrar en cámaras digitales, dispositivos móviles, entre muchos otros. Ahora bien, un sensor CMOS de pixeles activos es un sensor de detección de imágenes en el cual cada pixel tiene un fotodetector y un amplificador activo.

La forma más fácil de hallar un CMOS de bajo costo es en las cámaras web, hay diferentes cámaras pero en lo único en lo que va a variar es en la calidad de las imágenes capturadas y esto está determinado por el tamaño del pixel; entre más pequeños sean los pixeles mejor calidad de fotografías encontramos. Se desarmaron

3 cámaras web de marca desconocida para empezar a ver cómo son los detectores. El artículo de Ozcan menciona que el filtro protector que tienen los detectores fue removido para asegurar que la muestra siempre esté “pegada” al detector. Surge el primer problema, quitar el filtro a los detectores no es una tarea sencilla. Se logró quitar un filtro a uno de los detectores pero después de algún tiempo dejó de funcionar.

En un cuarto intento se adquirió una cámara web 300k con micrófono easy view de la marca Ateck con un costo de \$153, ver Figura 2.1,



únicamente en el esquema anteriormente mostrado (figura [1.4](#)) y en las fotografías mostradas en las referencias [4], [8] y [10]. En este punto se encontraron dos grandes ventajas: Al utilizar una cámara web evitamos la creación del software controlador del detector y se puede usar la interfaz USB.

### 2.1.1. Tamaño del pixel del detector

El siguiente trabajo fue realizado por Edgar Tochimani Castillo estudiante de la Licenciatura en Física de la FCFM BUAP. Al no tener especificaciones técnicas del detector que utilizamos (ver Figura [2.1](#) (b)) se procedió a determinar el tamaño del pixel por cuenta propia. Antes de continuar entendamos la interferencia constructiva como una superposición de dos o más ondas de frecuencias iguales, que al inteferir crean un nuevo patrón de ondas de mayor amplitud. Para poder determinar el tamaño del pixel del detector, se consideró al detector como una red ordenada de aberturas de difracción [5] en dos dimensiones. Para este tipo de arreglos la interferencia es constructiva, se obtiene cuando el ángulo entre el haz incidente y difractado cumplen con:

$$d \sin \theta = m\lambda \quad (2.1)$$

Donde  $d$  será la distancia de separación en cada plano de la red cristalina o red de aberturas de difracción, en nuestro caso será la distancia de separación entre cada centro de pixel dentro del detector como se muestra en la Figura [2.2](#),  $\theta$  es el ángulo de separación entre el rayo incidente y los planos de dispersión,  $m$  es un número entero y  $\lambda$  es la longitud de onda de luz que haremos incidir.

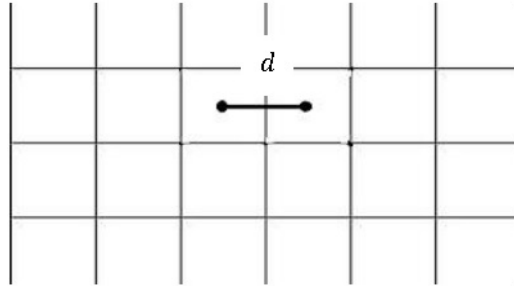


Figura 2.2: Configuración de un detector,  $d$  será la distancia de separación entre los centros.

El arreglo experimental usado para la determinación del tamaño del pixel se puede apreciar en la Figura 2.3. Para este experimento se uso un láser HeNe de  $\lambda = 632.8nm$ , como pantalla se utilizó una hoja milimétrica a la que se le hizo un orificio por el cual pasa el haz láser, incide sobre el detector y se difracta a la pantalla (ver Figura 2.4). Lo que se verá en la pantalla será el patrón de difracción generado por el detector como se muestra en la figura 2.5

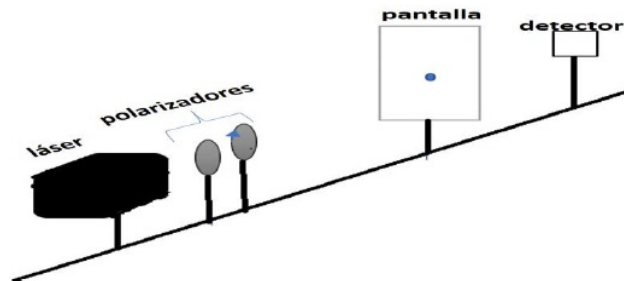


Figura 2.3: Esquema del arreglo experimental.

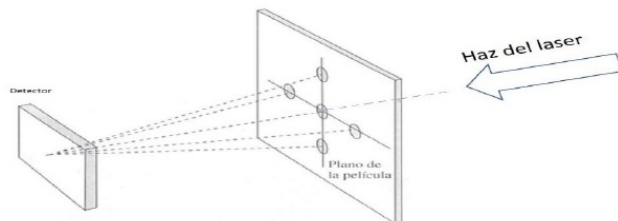


Figura 2.4: Haz reflejándose en el detector.



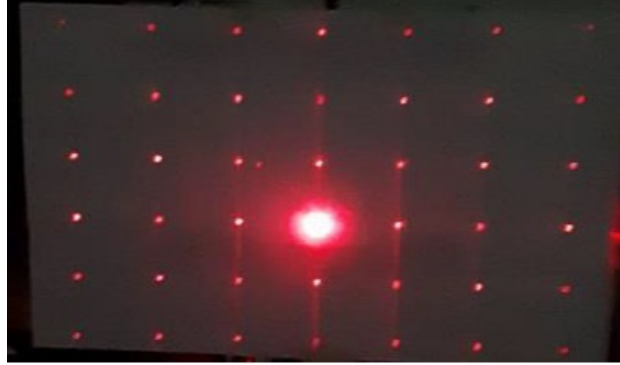


Figura 2.5: Patrón generado por el detector.

Con la ayuda de la ecuación (2.1) se determinó el valor de  $d$ , puesto que el ángulo se obtuvo utilizando el teorema de pitágoras y las demás variables ya son conocidas. Para poder determinar el ángulo se midió la distancia de separación entre la pantalla y el detector ( $l$ ) y se midió la distancia del punto por donde pasa el haz a los diferentes puntos que forma el patrón de difracción.

La distancia  $l = 44.9\text{cm}$  es la misma para todos y la longitud de onda utilizada como ya se mencionó fue de  $\lambda = 632.8\text{nm}$ . Al variar  $m$  desde 1 hasta 3 se obtuvo que en promedio el tamaño del pixel en dirección al eje  $X$  es de  $8.34\mu\text{m} \pm 0.04\mu\text{m}$  y en dirección al eje  $Y$  es de  $8.34\mu\text{m} \pm 0.04\mu\text{m}$ , lo cual nos indica que se trata de pixeles cuadrados.

## 2.2. La fuente de iluminación

Como se sigue paso a paso un artículo mencionado anteriormente [4], se acuerda utilizar un LED rojo. Se sabía que la fuente de iluminación debía estar frente al detector pero aún no se sabía de qué forma iba a estar acoplado. En primer lugar, debe hallarse la manera de mantener siempre encendido el LED. La forma más sencilla es conectarlo a la corriente eléctrica pero tomando en cuenta lo siguiente: Un diodo es un elemento biterminal; es

decir, tiene dos terminales. En los circuitos, los diodos son siempre elementos pasivos que absorben potencia. En varios elementos electrónicos las dos terminales son intercambiables, pero el caso de los diodos es muy distinto: un terminal es el positivo (ánodo) y el otro es negativo (cátodo), por ello que su símbolo es el siguiente:

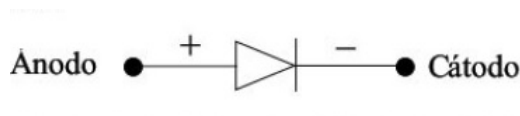


Figura 2.6: Símbolo de un diodo

Debido a esa diferencia entre sus terminales, no es lo mismo conectar el diodo en un sentido que en el contrario, ya que su comportamiento es muy diferente.

### 2.2.1. El diodo LED

LED(Light Emitting Diode): como indica el nombre en inglés, es un diodo que emite luz. En polarización directa, además de conducir la corriente, emite luz; en polarización inversa, por el contrario, no conduce. y en consecuencia no emite luz.

#### 2.2.1.1. Curva característica corriente/tensión

##### Diodo rectificador

La curva característica de un diodo es la relación entre la tensión en bornes del diodo y la corriente que circula por él.

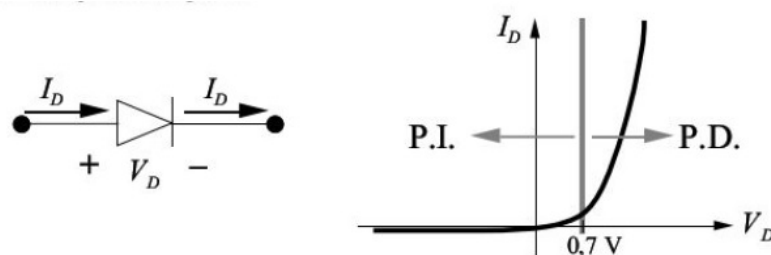


Figura 2.7: Curva característica

Donde  $I_D$  es la intensidad de corriente directa,  $V_D$  es la diferencia de potencial directa,  $P.D$  es la polarización directa y  $P.I.$  es la polarización inversa. Dicha curva se obtiene experimentalmente y, como resulta evidente, en el diodo, la relación entre la corriente y la tensión no es lineal sino exponencial.

Como se observa de la Figura 2.7, en polarización inversa el diodo apenas conduce corriente. En polarización directa, por el contrario, parece que la corriente atraviesa el diodo sin dificultades, pero podemos distinguir dos zonas: mientras la tensión es inferior a unos 0.7V, el diodo no conduce; sin embargo, por encima de ese valor, conduce sin dificultad alguna. A esta tensión de 0.7V que hay que superar para que empiece a conducir, se le llama tensión umbral, y normalmente ahí se pone la frontera entre la polarización directa y la inversa.

### 2.2.2. Construcción del circuito

Para el proceso, se inicia cortando la entrada micro-usb del cargador dejando expuestos los polos positivo y negativo del cable dúplex (cables rojo y negro). El cable positivo se suelda a un extremo de una resistencia, no importa cual, y en el otro extremo de la resistencia se suelda la parte positiva del LED (pata más larga), enseguida se cierra el circuito soldando el extremo libre del LED y el polo negativo del cargador. Ver Figura 2.8. Es conveniente

poner termofit a todo lo que se ha soldado a fin de proteger el sistema, este se coloca antes de aplicar la soldadura para después recorrerlo y solidificarlo exponiéndolo un poco al fuego. Algo importante que podemos mencionar es que es conveniente recortar los extremos de la resistencia y el LED lo más que se pueda, para así poder manipular fácilmente el LED, también conviene usar un cable dúplex suficientemente largo para mejorar la movilidad del microscopio, ver Figura 2.9

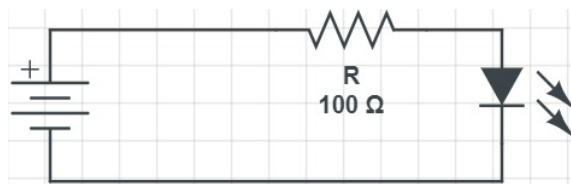


Figura 2.8: Circuito usado para el LED



Figura 2.9: Circuito armado

#### **2.2.2.1. Órdenes de Magnitud**

En el mercado hay diodos de muy diversas características, como algunos capaces de conducir corrientes elevadas, hasta los diodos con muy bajas corrientes.

#### **2.2.2.2. El diodo en polarización inversa: ruptura**

Al igual que en las resistencias, los diodos también tienen un límite superior en la potencia que pueden absorber, denominada

potencia máxima; si se sobrepasa dicha potencia, se queman. En el caso de nuestro interés, el diodo LED tiene una curva característica del mismo aspecto que el diodo rectificado; lo único que cambia es el valor de la tensión de umbral que suele estar entre 1.7V y 2.2V

Lo anterior mencionado implica que se necesita una fuente que de una corriente no muy grande. El mejor caso que cumple estas especificaciones es un cargador para celular, en nuestro caso se uso uno con las siguientes características:

- Adaptador ca/cc de entrada 100-240V a 0.5A con una salida de 5V

Lo único que faltaba es una resistencia de  $120\Omega$  aproximadamente ya que la intensidad típica que consume un LED es de 20mA. El circuito utilizado se puede apreciar en la Figura [2.8](#)

### 2.2.2.3. Espectro de emisión del LED

Después de que se terminó el circuito de la fuente de iluminación surge una pregunta sobre el LED. ¿Realmente es un LED que emite luz roja, o simplemente es un LED que emite luz blanca el cual tiene un recubrimiento rojo y a simple vista pareciera emitir luz roja? Para ello hay una propuesta de cómo saberlo, y es usar un espectrómetro. Al no tener acceso a dicho instrumento se opta por utilizar un espectroscopio escolar y se obtiene el espectro mostrado en la Figura [2.10](#) De este modo pudimos asegurarnos que el espectro del LED es rojo o al menos cercano a este. Una vez resueltas las dudas de nuestra fuente de iluminación se procedió a construir el pinhole.

Antes de proseguir cabe mencionar que:

1. El espectroscopio fue construido por Edgar Tochimani Castillo

- Se comparó el espectro del LED con el espectro de una lámpara para ahorradora (con longitud de onda conocida)

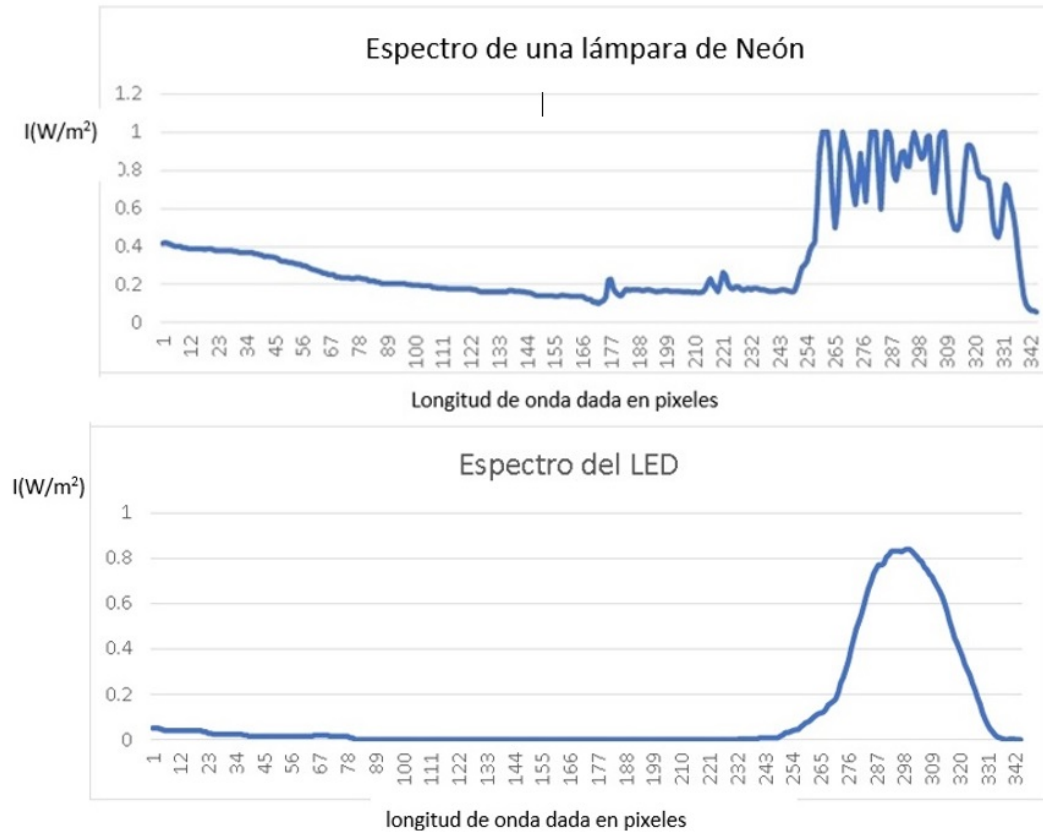


Figura 2.10: Espectro lámpara de neón y del LED usado

- Se concluyó que el LED emite entre  $\lambda_1 = 581.09nm$  y  $\lambda_2 = 669.23nm$  con un promedio de  $\lambda_{av} = 632.16nm$

#### 2.2.2.4. Tratamiento adicional del LED

Podemos notar que en la mayoría de LEDs, y en particular con el que se trabajó, existe una zona de plástico justo después de la parte activa emisora de luz. (Ver Figura 2.11). Se procedió a desgastar el plástico sobrante del LED hasta llegar justo a la parte activa, esto con la finalidad de garantizar que mayor cantidad de

luz pase por el pinhole. Para el proceso del lijado del LED sólo se debe raspar la punta de este. Para el comienzo del proceso se ha utilizado una lija de tela del número 80 y la técnica a utilizar fue la siguiente: durante todo el proceso se trata de "dibujar el número ocho" con el LED sobre la lija como si se tratase de un lápiz el LED esto con la finalidad de conseguir una uniformidad en toda la superficie. Después se cambia a una lija de menor número de puntos en concreto se utiliza una lija Fandeli ® A-99 320 HL. Resulta ser que esta lija es más conveniente pues es menos rugosa y se puede tener un mejor control al lijar.

No obstante, después del procedimiento de desgaste del LED (lijado) fue necesario darle tratamiento de pulido al plástico y así evitar tener un plástico esmerilado que esparcirá la luz. El pulido es la acción de alisar una superficie. Para esto, se utilizó el líquido para pulir que se utiliza en el laboratorio de pruebas ópticas de la FCFM BUAP. Tal líquido contiene partículas corrosivas que irán "alisando" la superficie. Una vez preparado el líquido, se rocía levemente la superficie que se desea pulir, en nuestro caso la cabeza del LED, enseguida se empieza a "tallar" la superficie contra tela de fieltro y unos minutos después se repite la técnica que se usó en el lijado (movimientos circulares en forma de ochos), acto seguido se cambia el fieltro por papel terciopelo y se repite el proceso hasta conseguir la superficie totalmente pulida. Ver Figura [2.12](#)



Figura 2.11: LED



(a) Lijado

(b) Pulido

Figura 2.12: LED lijado y Pulido

### 2.3. El Pinhole

Siguiendo la descripción del artículo de Ozcan [4], se hace un pinhole para colocarlo justo después del LED. Para ello, se utilizó la técnica de las agujas (ver Figura 2.13), que consiste en recortar



pequeños cuadros de papel aluminio ponerlos uno sobre otro, y todos en conjunto sobre una superficie rígida (se usó un portaobjetos) y después insertar una aguja muy fina en el centro de los cuadros, enseguida se va girando la aguja a fin de ir creando un pinhole en cada uno de los cuadros de aluminio. El resultado final de esta actividad es la obtención de pinholes de diversos tamaños, quedando el más pequeño en el último pedazo de papel. Algo que es importante mencionar es que el tamaño de los pinholes está en un intervalo  $[70\mu m - 150\mu m]$ . Se eligió un pinhole de un tamaño de  $123\mu m$  basándose en la proposición del artículo [4] (diámetro entre  $100\lambda - 200\lambda$ ). La longitud de onda de un LED rojo es  $633nm - 666nm$ .

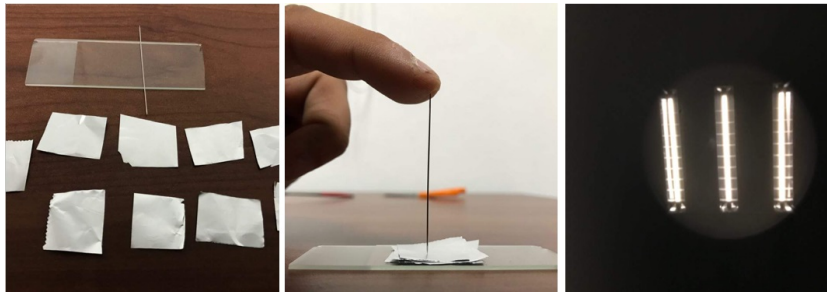


Figura 2.13: La técnica de las agujas para construcción de pinholes

### 2.3.1. La coherencia del sistema

La coherencia es una propiedad de la radiación. Hay dos tipos de coherencia distinguibles: coherencia temporal y coherencia espacial. La coherencia temporal está relacionada con la monocromaticidad que a su vez está relacionada con la longitud de los trenes de onda. La coherencia espacial está relacionada con la direccionalidad y la igualdad de fase de los frentes de onda y por tanto con el tamaño espacial de la fase. La coherencia temporal absoluta significa que la luz tiene una longitud de onda única (o frecuencia única). La coherencia espacial absoluta significa que la luz se emite desde un punto fuente (onda puramente esférica) o se

puede enfocar desde un punto único. Ver figura [2.14](#)

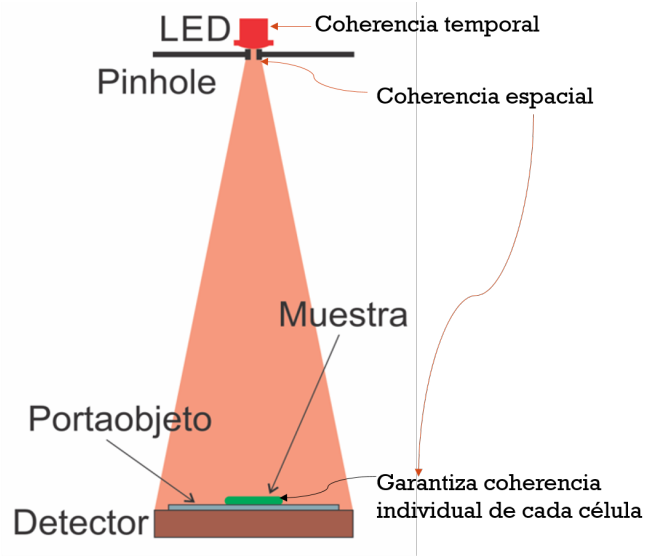


Figura 2.14: Esquema de la coherencia en nuestro sistema

En el artículo de Ozcan [4] podemos hallar un análisis en el cual se concluye que un pinhole con un tamaño de  $100\mu m$  es suficiente para garantizar la coherencia espacial requerida sobre cada célula, es por ello que podemos ver que es suficiente utilizar la técnica de las agujas para la construcción del pinhole de nuestro sistema. Por lo tanto, para una distancia de  $3 - 5cm$  entre la muestra, es suficiente con un pinhole de  $100\mu m$  de diámetro para garantizar la coherencia sobre una célula de  $10\mu m$  de diámetro.

## 2.4. Construcción del soporte

El soporte de nuestro primer diseño de microscopio consta de 3 partes esenciales

- Base para el CMOS
- Base para el LED y pinhole
- Varillas de acoplamiento

Para comenzar, el detector se colocó en una base semicircular de plástico [ver Figura 2.15 (a)] a la cual se le hizo un orificio circular. Al detector se le atornilló un pequeño aro de plástico [ver Figura 2.15 (b)] con el que se sostenía la lente, así el pequeño anillo entra perfectamente en el orificio y queda bien sujeto el detector, con movilidad muy reducida. Lo siguiente fue construir la base para el LED junto con el soporte para el pinhole. Para esta parte se utilizaron dos placas pequeñas de nylomaq [ver Figura 2.15 (c)]. Dentro de estas dos placas el pinhole queda atrapado. El nylomaq, por sus buenas propiedades mecánicas, rigidez, dureza, tenacidad, bajo coeficiente de fricción, resistencia al desgaste y facilidad de maquinado es considerado como la primera alternativa para la fabricación de componentes sometidos al desgaste y elementos estructurales. El orificio de la placa pequeña fue hecho con una broca de 4mm ya que es la misma medida del diámetro del LED que se usa y el orificio de la placa pequeña se hizo con una broca de 1mm. Para poder unir la base del detector y la del LED se utilizaron dos varillas de metal a los extremos, teniendo cuidado que la distancia entre el LED y el detector sea entre 3 y 5 cm según marca el artículo. Finalmente todo se acopló mediante dos varillas metálicas [ver Figura 2.15 (d)].

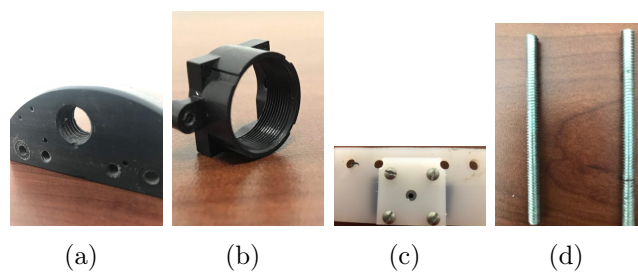


Figura 2.15: Estructura del Microscopio

En la Figura 2.16 podemos apreciar la primera versión terminada del microscopio construido.



Figura 2.16: Microscopio primera versión

## 2.5. Segunda Versión del Microscopio sin Lentes

Antes de seguir con el trabajo de investigación se toma la decisión de construir lo que es conocido como la segunda versión del microscopio sin lentes. Para esto se utiliza el mismo principio elemental que fue usado para la primera versión del microscopio, es decir un LED, un pinhole y un detector CMOS (ver Fig. 2.14).

Esta vez se optó por introducir todos los elementos (CMOS, LED y muestra) dentro de tres pequeños tubos de plásticos los cuales se pueden acoplar uno dentro del otro para cerrar la estructura completa y así evitar que entre la luz. En la Figura 2.17 se puede apreciar el primer tubo al cual se le hicieron cuatro pequeños orificios para atornillar las 4 esquinas del detector haciendo uso de los mismos tornillos con los que estaba acoplado a la cámara web.

Las dimensiones de este primer tubo son las siguientes:

- $D_{interior} = 29.43mm$
- $D_{exterior} = 42.10mm$

- $l = 57.61mm$



Figura 2.17: Primer tubo el cual sostiene al detector CMOS

Nótese que en un costado del tubo se le ha hecho un orificio alargado de una distancia de  $14.40mm$  y un ancho de  $1.34mm$  esto con la finalidad de que por ahí pueda salir el cable microusb que es el que sirve de interfaz entre el detector CMOS y un puerto USB.

El segundo tubo lo podemos apreciar en la Figura [2.18](#) que sirve como acoplador de todo el sistema ya que una de sus funciones es unir el tubo que contiene al detector y el tubo que contiene al LED. Se puede apreciar que se le han hecho dos cortes en el borde superior esto con la finalidad de que sirva como entrada para la muestra la cual será colocada sobre el portaobjetos. Se le colocó en cada uno de los lados fieltro para evitar que el plástico raspe el vidrio del portaobjetos al mover la muestra para observarla desde distintos puntos y otra de las funciones del fieltro es para asegurar un mejor equilibrio, es decir, que no exista algún ángulo entre el plano de la muestra y el plano del detector.

Las medidas del segundo tubo son las siguientes:

- $D_{interior} = 41.90mm$
- $D_{exterior} = 48.63mm$

- $l = 57.61mm$
- La distancia que existe entre la fuente de iluminación y la muestra es de  $35.51mm$



Figura 2.18: Segundo tubo: acoplador del sistema.

Finalmente el tercer tubo del nuevo sistema sirve para sujetar el LED junto con su circuito, podemos ver (Figura 2.19) que en uno de los extremos se le ha hecho un orificio para que el cable duplex que sirve de alimentación salga hacia el tomacorriente. Ya que el pinhole debe ir pegado al detector se construyeron dos pequeños círculos de Nylomaq para mantener "pegado" el pinhole al LED. Justo en el centro del primer círculo se le hizo un orificio de  $4mm$  para que pueda entrar la punta del LED y así garantizar que el pinhole estará pegado justo después del LED. Estos dos círculos se unen entre si gracias a 3 tornillos y estos a su vez se unen con 3 tornillos adicionales al tercer tubo.

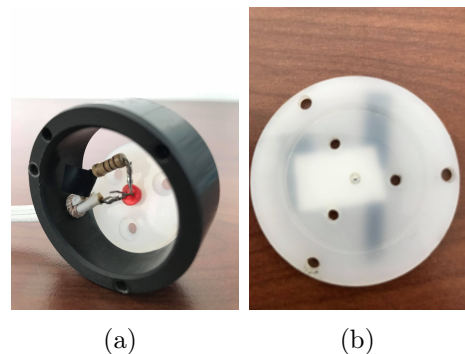


Figura 2.19: Estructura del Microscopio

La versión final del segundo microscopio se puede apreciar en la Figura 2.20. Nótese que el sistema se puede invertir en caso de ser requerido. Al decir que el sistema se puede invertir, nos referimos a que el detector puede quedar en la parte superior del montaje y en la base inferior estaríamos encontrando la fuente de iluminación. Esto es útil ya que en ocasiones es necesario trabajar con muestras que contienen ya sea agua o alguna solución salina, por lo tanto un derrame del líquido podría dañar el detector; he ahí la ventaja de poder invertir el sistema sin afectar el funcionamiento del mismo.

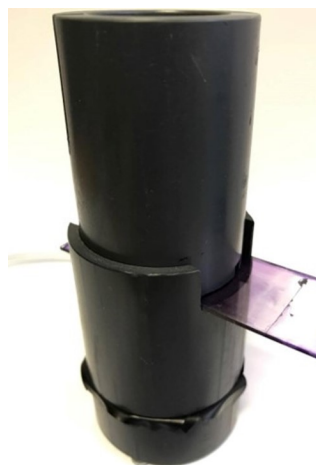


Figura 2.20: Microscopio sin lentes V2.0

Es imperativo mencionar que no se usó la misma marca de detec-

tor CMOS que fue utilizada en la primera versión del microscopio; en su lugar, el nuevo microscopio opera con un CMOS de la marca Sony® que fue extraído de una cámara NexImage 5 Solar System Imager Celestron. Al usar este nuevo sistema contamos con 3 ventajas:

- Cable USB 2.0
- El tamaño del pixel ya es especificado  $2.2\mu m$
- Resolución de las imágenes hasta de 2592x1944

Como era de esperarse la calidad de las fotografías mejoró considerablemente al tener una mejor resolución y esto se debe al tamaño del pixel. Con este resultado se puede afirmar entonces que el tamaño de pixel de nuestro primer microscopio es mucho mayor.

En conclusión de este capítulo podemos decir que hemos sido capaces de construir dos versiones del microscopio sin lentes las cuales cumplen las características necesarias para funcionar.



# Capítulo 3

## Errores y Pruebas

### 3.1. La Primera Muestra

Una vez terminada la construcción de nuestro microscopio, se empezó a trabajar con muestras. La muestra fue de un corte transversal muy delgado de apio (ver Figura 3.1) pero fue totalmente inútil ya que no se observaban buenas imágenes y es lo que necesitábamos para comenzar a trabajar. En esta etapa del trabajo, no se prestaba atención de cómo se ponía la muestra, tamaño de los pixeles, a la distancia que existe entre el plano del detector y el plano de la célula (zccd), etc. De ahora en adelante nos referiremos a zccd como la distancia entre plano del detector y el plano de las células a menos que se indique lo contrario. Se intentó hacer una muestra con partículas de humo para analizarlas pero se obtuvieron los mismos resultados igualmente malos. Entonces se tenían las siguientes dificultades:

- Con las muestras trabajadas no era posible obtener buenos patrones de difracción o al menos no bien definidos.
- No era fácil ubicar la misma zona en el campo de visión.
- Existía una diferencia entre las fotos si la muestra se coloca con el cubreobjetos pegado al detector o si el cubreobjetos se pone más cercano a la fuente de iluminación, es decir, existe

una distancia mayor debido a que el grosor del portaobjetos juega un papel al agregar un milímetro más.

Se empieza a analizar el artículo “Ultra wide-field lens-free monitoring of cells on chip” [10]. Este artículo a diferencia de los otros no trata sobre la reconstrucción de los patrones de difracción vistos como hologramas, más bien como el nombre indica, el artículo trata el tema del conteo de células así como la calibración del microscopio. Fue en este punto cuando se vio la necesidad de empezar a caracterizar el instrumento, y con esto nos referimos al tamaño físico del detector, el grosor del filtro, la zccd y lo más importante el tamaño del pixel, ya que con esto se determinaba de algún modo el tamaño físico del tamaño de los patrones de difracción. El primer intento para hallar todas estas características fue con la caja del producto pero la única especificación marcada, es que captura fotos y videos con una resolución de 640x480 pixeles. Por eso se procedió a caracterizar con recursos propios el detector como se redacta en el Capítulo 2 Sección 2.3.

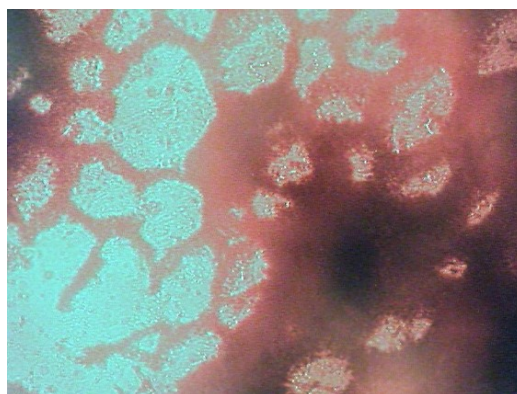


Figura 3.1: Corte transversal de apio

## 3.2. Pantallas de celulares

Resulta ser que las pantallas de los celulares de generación anterior están compuestas por varios elementos tales como polariza-

dores, y algunos filtros de luz. Lo interesante fue que al hacerle pasar un haz de láser a uno de los varios filtros que conforman la pantalla, se podía observar un patrón de difracción como si se tratase de una rejilla de difracción. Esto sugería la idea de que existían ciertas perturbaciones en la placa de plástico que producían el patrón que se formaba. Al examinar con una lente simple el plástico transparente, se podía observar con algo de dificultad que había unas pequeñas esferas incrustadas en el plástico y esto era una gran noticia ya que podíamos usar esas esferas para observarlas con nuestro microscopio. Para ello, simplemente se colocó el plástico sobre el detector y se encontró lo que se muestra en la figura 3.2



Figura 3.2: Pantalla celular vista con microscopio sin lentes

No obstante, lo que había parecido ser una muestra óptima resultó ser nada idónea para nuestros fines. En primer lugar, tras las esferas aparecen unas líneas inclinadas, un “rayado” el cual iba a interferir en lo que se pensó para la reconstrucción. Y el problema mayor, el cual no se vio en aquel entonces es que no se obtienen patrones típicos de difracción, esto, como se verá más adelante, es porque lo más probable es que estamos ante la parte de la óptica geométrica (tamaño de sombra = tamaño del objeto) de nuestra gráfica “tamaño sombra vs tamaño objeto” (para información detallada ver Capítulo 6, Sección 6.1, Figura 6.1), esto se confirmó cuando se caracterizaron las esferas pues tienen un diámetro de

$\cong 100\mu m$ .

### 3.3. Rejillas de Bironchi

En un intento adicional de conseguir muestras propias se tuvo la idea de trabajar con rejillas de bironchi. Pero al no tener aún un programa para poder determinar el tamaño del la sombra (que es lo mismo que el tamaño del patrón de difracción) que producen nos limitamos simplemente a caracterizar la rejilla en el microscopio óptico y sólo capturar fotografías con nuestro microscopio. Al caracterizar nuevamente con el microscopio óptico se encontró que las medidas de la rejilla de bironchi que se usó son:

- Distancia entre cuadros:  $245.618\ \mu m$
- Tamaño del cuadro:  $264.16\ \mu m$

Se puede observar que sí se genera patrones de difracción (ver figura 3.3) de cada cuadro en la rejilla de bironchi, pero reiteradamente hoy sabemos que no es útil este tipo de patrón para nuestro trabajo ya que los objetos con los que mejor se ha estado trabajando y han arrojado resultados consistentes tienen medidas que van desde unos cuantos micrómetros hasta por mucho unos  $50\mu m$ . No se continuó trabajando más con la rejillas de prueba de birronchi.

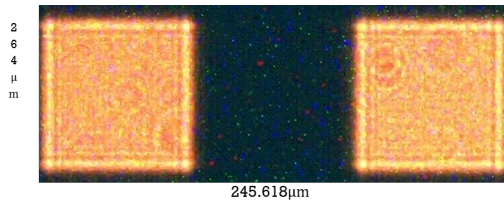


Figura 3.3: Patrones de Difracción de una rejilla bironchi

### 3.4. Primeras Muestras de Sangre

Al notar que no es favorable el trabajo con las rejillas de bironchi se volvió a buscar muestras más acordes a nuestras necesidades, es decir, muestras que estuvieran en un intervalo entre 0 y  $50\mu m$ , y que generaran un buen patrón de difracción para poder observarlas mejor, caracterizarlas y más adelante incluso reconstruirlas. La respuesta para dichas muestra se encontraba también en el artículo que se estaba siguiendo y resultaban ser muestras de eritrocitos. A grandes rasgos [6] las muestras a trabajar fueron preparadas de la siguiente manera: sobre un portaobjetos se colocó una gota de sangre previamente disuelta en solución salina [6]; luego se procede a aplicar colorante a la muestra [6], esto con la finalidad de poder observar mejor las células al menos en un microscopio óptico; después sobre la muestra se coloca un cubreobjetos y finalmente se aplica una resina especial [6] para poder fijar y encapsular las células. Ver Figuras (3.4 y 3.5)

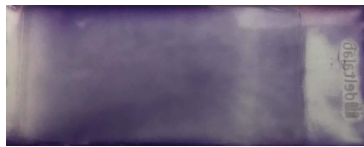


Figura 3.4: Muestra de sangre preparada

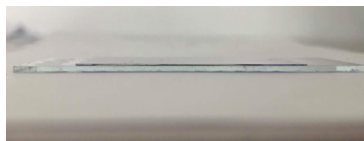


Figura 3.5: Muestra de sangre preparada vista de perfil

El problema ahora se encontraba en las fotos capturadas. En la figura 3.6 se muestra una foto de la muestra de sangre en un microscopio óptico convencional con una amplificación de 40x mientras que en la figura 3.7 se muestra la misma muestra tomada con

nuestro microscopio sin lentes. Es importante mencionar que el sellador que se utiliza para fijar las células al portaobjetos no se observa en el microscopio óptico porque es un objeto transparente [11], apartir de esto suege un idea la cual no ha sido verificada pero podríamos estar ante el patrón de difracción del sellador el cual se puede apreciar en nuestro microscopio posiblemente se trate de un objeto de fase.

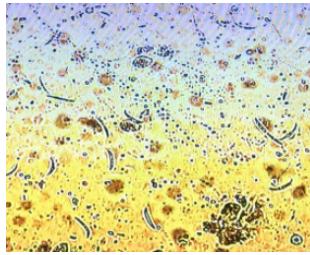


Figura 3.6: Células vistas en micoscopio óptico 40x

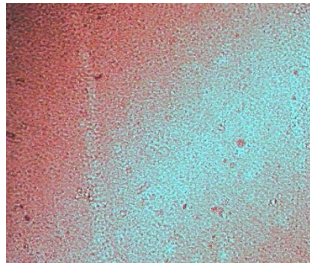


Figura 3.7: Células vistas en micoscopio sin lentes

Es importante mencionar que hasta este punto las Figuras 3.6 y 3.7 son meramente ilustrativas pues tienen aún problemas para analizarlas de manera cuantitativa ya que no se usaba alguna técnica de asilamiento de células (Ver Capítulo 4) además de que se desconocía la distancia zccd. No obstante, de este primer trabajo con células de sangre podemos concluir los siguientes puntos que no se habían presentado hasta en aquel momento.

- El campo óptico era muchísimo mayor de lo que se estipulaba, pues en comparación con el microscopio óptico convencional

se pueden apreciar más elementos para estudiar.

- Ya en la práctica, esta muestra no era de utilidad, ya que no podemos discernir con claridad los patrones de difracción de las diferentes células en la fotografía que es con lo que se empezaría a trabajar.

Una solución rápida [7] era simplemente mover la zona en la que se estaban observando las células hacia la zona del borde del cubreobjetos, lo que sucede es que al momento de colocar el sellador y el colorante, la población de células es muy baja pues estas tienden a acumularse en el centro del cubreobjetos dejando la zona de los bordes con muy baja densidad de población.

Pese a que en efecto en el borde del cubreobjetos hay menos células que en el centro (ver Figura 3.8) aún con el cambio de zona se puede apreciar que existen muchas células y todavía los patrones de difracción no pueden ser aislados y aparecen nuevamente superpuestos unos sobre otros.

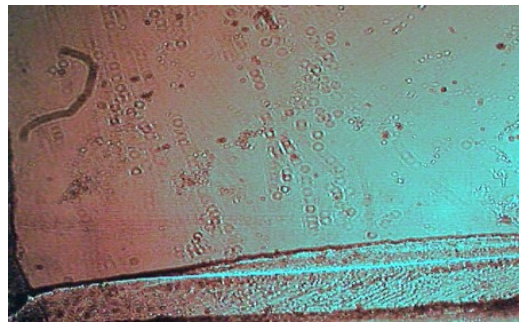


Figura 3.8: Células vistas en microscopio sin lentes

### 3.5. Trabajando con Parásitos

Debido al intento fallido de la primer muestra de eritrocitos fue necesario ampliar nuestra colección de objeto a estudiar, por ello se intenta reproducir el análisis de muestras siguiendo al mismo

autor. Esta vez se trata de reproducir el artículo "Detection of waterborne parasites using field-portable and cost-effective lensfree Microscopy"[8]. En este artículo se ve una aplicación al microscopio la cual es directa e inmediata y que los autores preveían ya en los artículos anteriores. Tal aplicación es en la parasitología para detección de cuerpos extraños en agua. Ahora se desea trabajar con soluciones homogéneas y heterogéneas de dos protozoarios patógenos que son *Giardia Lamblia Cyst* y *Cryptosporidium Parvum* que comúnmente los podemos hallar en brotes de agua contaminada que suele beberse.

A partir de los patrones de difracción que se pueden observar, se tiene que determinar de algún modo el tamaño de los patrones y de las muestras; se decidió seguir el artículo para estar en concordancia con el autor. Para empezar a reproducir esos resultados era necesario tener acceso a los parásitos mencionados, pero debido a la dificultad de encontrarlos por medios propios lo único con lo que se trabajó a propuesta del M.C. José Manuel Rodríguez Luna [9] fue con muestras de agua contaminada pero sin saber exactamente con qué parásitos eran con los que nos enfrentábamos, no se tuvo acceso al tamaño de los parásitos, es decir, la muestra no estaba caracterizada. La única información que se tiene es que en promedio las muestras oscilan entre  $50\mu m$  y  $100\mu m$ : el agua contaminada contenía tanto parásitos como bacterias. Otro aspecto que es necesario mencionar es que no fue posible hacer una muestra ya sea homogénea o heterogénea solamente con parásitos, y cómo aún no se tenía desarrollado un programa para la determinación del diámetro de los patrones de difracción o de los parásitos nos limitamos simplemente, una vez más, a capturar fotografías y apreciar los patrones de difracción. En conclusión, para proseguir con el trabajo es necesario hacer uso de programas de cómputo para que no nos quedemos simplemente con un carácter cualitativo.



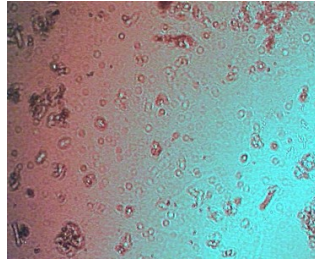


Figura 3.9: Parásitos vistos con el microscopio sin lentes

En la Figura [3.9](#) se muestra la fotografía obtenida al observar una gota de agua contaminada. La preparación fue muy simple: colocar una gota de agua sobre un portaobjetos y sobre la gota colocar un cubreobjetos. Al no tener caracterizadas las muestras no se pudo avanzar más en esta parte del proyecto; sin embargo, hay algunas cosas que podemos retomar de este sencillo experimento:

- Hay una gran dificultad al trabajar con organismos vivos ya que al no mantener siempre la misma posición en el campo de visión aumenta en gran medida el trabajo de poder aislar los patrones de difracción.
- Al no trabajar con eritrocitos (objetos planos circulares) notamos que no siempre se obtienen patrones de difracción cuya forma sean círculos concéntricos
- Los patrones siguen siendo muy diferentes a los que plantea el artículo que se está siguiendo (ver fig. [3.10](#) )

### 3.6. Primeras Microesferas

Al no tener aún muestras eficientes para el trabajo de investigación se vuelve a retomar el primer artículo a seguir "Ultra wide-field lens-free monitoring of cell on-chip". El primer experimento

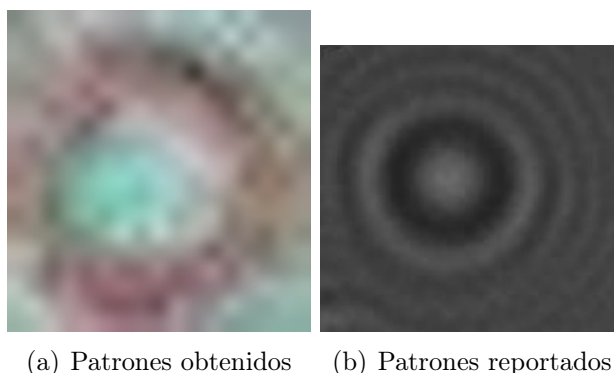


Figura 3.10: Comparación patrones

que se reporta en el artículo no es con parásitos o con eritrocitos sino más bien con microperlas de poliestireno y en realidad es un experimento que los mismos autores catalogan como " un principio de prueba". Inicialmente, para empezar a monitorear muestras los autores trabajan con microperlas de diferentes tamaños (diámetros de  $20 \pm 0.98\mu$ ,  $10 \pm 0.73\mu$ ,  $5 \pm 0.41\mu$  y  $3 \pm 0.15\mu$ ) así como diferentes concentraciones. Se diluyen las esferas en agua desionizada. Al notar que se realiza el experimento con tanto control en la caracterización de las microperlas se llega a la conclusión que primeramente se debe de algún modo calibrar el microscopio, es por ello que se utilizan microesferas de tamaño ya conocido.

Una vez más no es posible trabajar con muestras que tengan las mismas características que las que son reportadas en el artículo. Se solicitaron microesferas empero desgraciadamente sólo se consiguieron microesferas de poliestireno pero de tamaño desconocido, al igual que su transmitancia, índice de refracción, etcétera. Una vez más se sacaron fotos de las muestras; una de ellas se presenta en la Figura [3.11](#)

Algunos puntos que hay que rescatar de estas muestras son los siguientes:

- Para poder empezar a utilizar nuestro microscopio era necesario calibrarlo como lo hacen en el artículo a seguir, sin

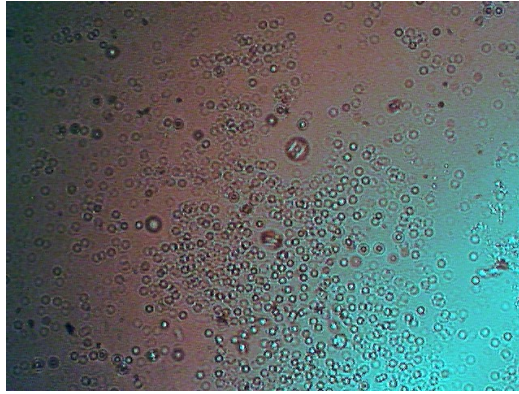


Figura 3.11: Microesferas vistas en el microscopio sin lentes

embargo no se tenía bien la idea de cómo realizar esta calibración si no era posible conseguir muestras debidamente caracterizadas.

- Mientras no se tenía acceso a muestras como las que necesitábamos, la mejor opción era hacer una simulación de muestras.
- Reiteradamente se tiene el mismo problema, existe una gran densidad de población que por entonces no era posible controlar o en mejor medida disminuir y, por ende los patrones de difracción que aparecen siguen traslapándose o intersectándose
- En conclusión, las microesferas tal cual estaban no eran de utilidad en ese momento.

Más aún, se nos solicitó determinar el tamaño de las micropartículas y al no tener aún desarrollado un algoritmo nos damos cuenta que para continuar con nuestra investigación es necesario desarrollar un programa que en principio pueda estar relacionado con un algoritmo de simulación de muestras, el cual pueda determinar primero el tamaño del patrón de difracción utilizando la fotografía de las muestras y a partir de esto poder determinar el tamaño de la célula, microesfera o de la muestra en cuestión.



## Capítulo 4

### Aislamiento de Células

#### 4.1. ¿Por qué aislar las células?

Al momento de calibrar nuestro instrumento, lo ideal es hacerlo a través de una muestra bien caracterizada. Para ello es ineludible saber los tamaños precisos de la muestra con la que se está trabajando. La muestra utilizada para calibrar nuestro microscopio fue de eritrocitos humanos, se optó por utilizar los eritrocitos porque no se tenía algo más a nuestro alcance y era lo más sencillo de preparar para medir por nosotros mismos. Los eritrocitos fueron obtenidos a partir de muestras que nosotros preparamos (en la sección [4.2.4](#) se menciona la forma de preparación de los eritrocitos). No obstante, es sabido que el tamaño de los eritrocitos está en promedio en  $7.5\mu m$  [12], [13], entonces al ser un promedio fue necesario medir por nuestra cuenta los diferentes tamaños de células que se observaban. Para ello, se utilizó un microscopio óptico con una amplificación de hasta 8x el cual contiene dos tornillos micrométricos acoplados al tambor de la plantina para poder medir sobre un plano x-y y cuya medida mínima es de 2.54 micrómetros. Lo que se pretendía hacer es observar la muestra primero en el microscopio óptico, escoger una célula, medir su diámetro y después observar el patrón de difracción que produce esa misma célula para así empezar a calibrar y determinar su tamaño a través de su

patrón de difracción. En el primer intento de observar la misma célula en ambos microscopios se halla la dificultad de hacerlo pues no es tarea sencilla ubicar la misma zona que se quiere observar y si se llega a lograr al tanteo, la otra dificultad es que a simple vista una misma célula es aún más difícil de ubicar en el microscopio sin lentes tan sólo con el patrón de difracción, esto debido a que el campo de visión del microscopio óptico es muy restringido y por otro lado esto sucede porque en el microscopio sin lentes existe una amplificación muy pequeña de 2x aproximadamente aunque un campo de visión muchísimo más grande. En las Figuras 4.1 y 4.2 se aprecia la misma muestra y la misma zona vista en ambos microscopios. Algo de interés que podemos destacar de esta parte es que desde ese momento hemos podido apreciar que existen más objetos de los que en el microscopio óptico se observan. Esto se debe a que posiblemente nuestro microscopio es capaz de observar objetos de fase, como partículas de polvo y sellador de muestras, entre otros.

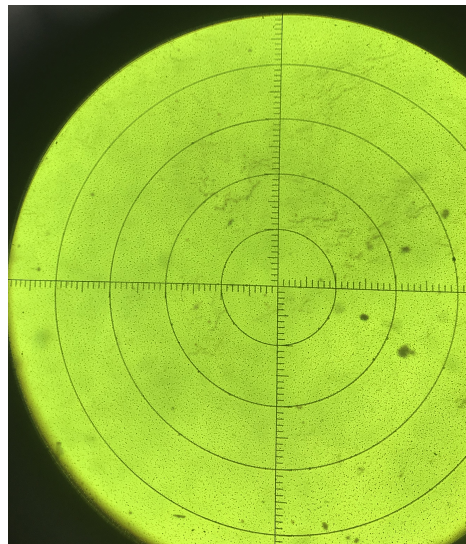


Figura 4.1: Eritrocitos vistos en el microscopio óptico

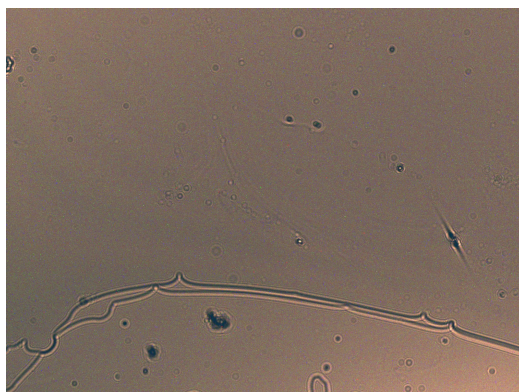


Figura 4.2: Eritrocitos vistos en el microscopio sin lentes

## 4.2. Propuestas para realizar el aislamiento de células

### 4.2.1. Papel adherible sobre el portaobjetos

La primera propuesta para aislar muestras es trabajar directamente con el portaobjetos que ya tiene la muestra. Si podemos de algún modo separar en partes iguales al portaobjetos y luego etiquetar cada parte, parecería una muy buena idea para comenzar a trabajar. Lo que usamos fue papel autoadherible también llamado papel calcomanía. Se recortó una porción de papel calcomanía con las mismas dimensiones que el portaobjetos  $75mm \times 25mm$ , la porción de papel se divide en 10 cuadros de las mismas dimensiones y luego cada cuadro se nombra de diferente manera, antes de pegar el papel calcomanía al portaobjetos a cada cuadro se le hace un pequeño orificio (3mm) con una perforadora delgada. La técnica para etiquetar el portaobjetos se ilustra en la Figura 4.3

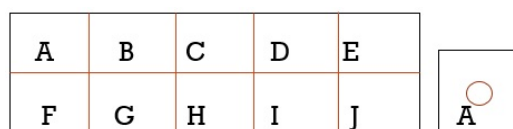


Figura 4.3: Primer intento de aislar células

El problema con esta técnica es que en realidad no se estaba aislando de ninguna manera la muestra. Se estaba realizando totalmente al azar el proceso de aislamiento y entraba en juego la probabilidad de esperar que únicamente una célula o un grupo reducido de células quedaran atrapadas en los orificios realizados, pero ya que la distancia entre las células es de unas cuantas micras este primer intento fue totalmente nulo y al final se tuvo que desechar y empezar a buscar otras opciones.

#### 4.2.2. Acotar una parte de la muestra

La siguiente idea a poner en práctica fue observar primero con el microscopio óptico la muestra, encontrar una zona en la que se observe una baja densidad de población de células y de manera manual empezar a acotar esa zona ya sea pegando una hoja de papel o algún objeto el cuál no deje pasar luz y de algún modo ir creando un orificio. En nuestro caso se utilizó cinta de aislar negra. El resultado de esta técnica para aislar zonas de la muestra se puede apreciar en la Figura [4.4](#)

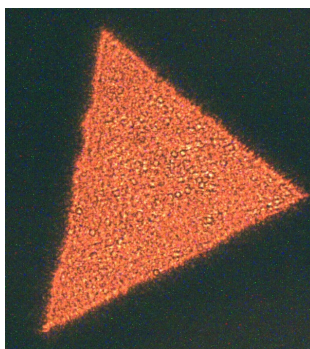


Figura 4.4: Primer intento de aislar células

Sin embargo vemos que el problema persiste, aunque hayamos logrado acotar cierta zona de la muestra, la zona que dejamos libre para observación sigue presentando una superposición y traslapamiento de los patrones de difracción de las células.



#### 4.2. PROPUESTAS PARA REALIZAR EL AISLAMIENTO DE CÉLULAS<sup>51</sup>

En un segundo intento se trató de colocar dos cintas delgadas muy juntas de tal modo que alguna célula quedara atrapada entre ellas, se tuvo éxito y en el microscopio óptico se lograba apreciar una célula aislada, pero al momento de trasladarnos al microscopio sin lentes se pierde el patrón de difracción de la célula porque lo que no esperábamos es que al momento de juntar mucho la cinta de aislar esta misma genera su propio patrón de difracción y esta vez éste es el que interfiere con el patrón de la célula que se esperaba observar (Ver Figura 4.5). Por esta razón parece ser que este método no es el más adecuado y por el momento se ha descartado.

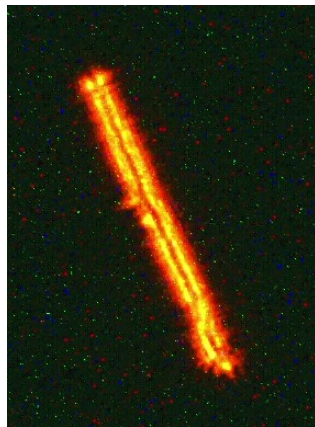


Figura 4.5: Patrón de difracción de la cinta

##### 4.2.3. Cortar el portaobjetos antes de colocar la muestra

La siguiente idea con la que se trató de eximir nuestro problema con la muestra fue trabajar no con la muestra en sí, sino más bien con el portaobjetos; es decir, se tuvo la idea de hacer pequeños portaobjetos a partir de los originales y después pedir que se prepararan las muestras en esos nuevos portaobjetos pequeños. Debido a que no existen portaobjetos más pequeños a la venta optamos por construir los nuestros a partir de cortes hechos

a portaobjetos grandes. La tarea ahora fue realizar los cortes de manera precisa sin que se rompieran los vidrios.

Como ya se ha mencionado antes, los portaobjetos con los que se trabajó tiene una medida de  $25 \times 75 \text{ mm}$ , con la ayuda de un cortavidrio de punta de tungsteno se hicieron cuatro intentos de cortarlos en piezas de  $3.75 \times 2.5 \text{ mm}$ ; para esto se cogió un portaobjetos y se procedió a cortarlo de manera natural, es decir, se apoya el cortavidrio sobre el vidrio y se trató de cortar el vidrio con una sola pasada. Los resultados fueron nulos ya que en todos los intentos se rompió el portaobjetos. Después de esto, se intentó cortar el vidrio de otro modo: en la zona en la que se va a cortar se lubrica ligeramente con diesel (sólo unas gotas) y después con el cortavidrio de tungsteno se va raspando hasta que se logre un corte en el vidrio (el proceso de ir cortando se hace como si el cortavidrio fuese una pequeña sierra). Al usar esta técnica se obtuvo un buen resultado salvo algunas irregularidades justo en el borde donde se empieza a cortar, pero en general fue un corte considerablemente bueno. Después del corte, las orillas del vidrio se "lijaron" con una piedra para "asentar", esto simplemente con la finalidad de no cortarse al manipular el portaobjetos. Si se desean cortes aún más pequeños o de ese mismo tamaño pero con mayor precisión se pueden hacer los cortes con un cortavidrios de punta de diamante y se obtienen buenos resultados. Sin embargo, el problema principal aquí es la dificultad que hay al preparar la muestra en portaobjetos tan pequeños nunca conseguimos colocar muestras en estos vidrios por lo que no se siguió con esta forma de disminuir la densidad de población de las células.

#### 4.2.4. Dilución de una muestra de sangre

En química, la dilución es la reducción de la concentración de alguna sustancia en una disolución; en otras palabras, la dilución consiste en rebajar la cantidad de soluto por unidad de volumen

#### 4.2. PROPUESTAS PARA REALIZAR EL AISLAMIENTO DE CÉLULAS<sup>53</sup>

de la disolución. Se logra al adicionarle más diluyente a la misma cantidad de soluto: se toma una poca porción de una solución y después esta misma se introduce en más disolvente.

Por otro lado, es bien sabido que el valor normal de glóbulos rojos en la sangre de una persona promedio es de 5 millones/ml. En nuestro caso, al no tener una forma de aislar una muestra de glóbulos rojos la mejor opción que se pudo encontrar es hacer nuestras propias muestras y diluirlas para disminuir la cantidad de glóbulos rojos.

A continuación explicamos el proceso que seguimos. Lo primero que se tuvo que hacer fue conseguir sangre fresca, al principio acudimos a un laboratorio químico para obtener un poco de sangre la cual nos la proporcionaron ya diluida; tiempo después nosotros empezamos a hacer nuestras propias diluciones.

Para realizar nuestras propias muestras lo primero que necesitamos es una gota de sangre. Una gota contiene 0.05ml, así que según lo estimado tendríamos 250 mil eritrocitos en una sola gota de sangre, después esa gota se coloca en un tubo de ensayo con 10ml de solución salina, es necesario usar solución salina ya que al usar agua natural, destilada o desionizada los eritrocitos se rompen. Lo que se realizó a continuación se le conoce como hacer una dilución seriada que es la disolución repetida de una solución para ampliar el factor de dilución. En total, la gota de sangre se diluyó en 5 tubos de ensayo. Esto significa que cada tubo de ensayo estará 10 veces más diluido comenzando por el tubo sin diluir.

Podemos expresar las diluciones de la siguiente manera: 0.05 : 10, 0.05 : 100, ..., 0.05 : 100000 donde la primera y la última expresión corresponden al primer y último tubo respectivamente. Ahora bien, la proporción total de la dilución puede determinarse al multiplicar el factor de dilución de cada paso hasta llegar al

último. Matemáticamente tendríamos:

$$D_T = \prod_{i=1}^n D_i \quad (4.1)$$

donde  $D_T$  es el factor total de la dilución y  $D_i$  es la proporción de la dilución. Por lo tanto,  $D_T = 1 \times 10^5$ . La concentración de la sustancia es ahora 100 mil veces menor que la original y por ellos tendremos:

$$C_{final} = \frac{C_{inicial}}{D_T} = \frac{25 \times 10^4}{1 \times 10^5} = 2.5 \text{ eritrocitos}/0.05 \text{ ml}$$

Donde  $C_{final}$  es la concentración final y  $C_{inicial}$  es la concentración inicial. Lo siguiente que debemos hacer simplemente extraer una gota de la última disolución, colocarla sobre un portaobjetos y finalmente colocarle un cubreobjetos. Se hicieron varias pruebas y en una de ellas se tomó la decisión de no colocar cubreobjetos sobre la gota con la finalidad de que nada se expandiera y fuera más fácil de observar las células, se dejó secar la gota durante 14 horas pero el resultado fue malo ya que quedaban restos de sal, como era de esperarse, y más aún estos restos generan su propio patrón de difracción el cual observamos con nuestro microscopio (Figura 4.6), por esta razón al final se decide a todas las demás muestras que se prepararan colocarles su cubreobjetos como es lo habitual. Al no usar colorante ni un sellador especial nuestras muestras son un poco más difícil de observar y no duran mucho tiempo encapsuladas, estos dos últimos puntos son dos desventajas importantes pero son compensadas con la sencillez de prepararlas.

#### 4.2. PROPUESTAS PARA REALIZAR EL AISLAMIENTO DE CÉLULAS<sup>55</sup>

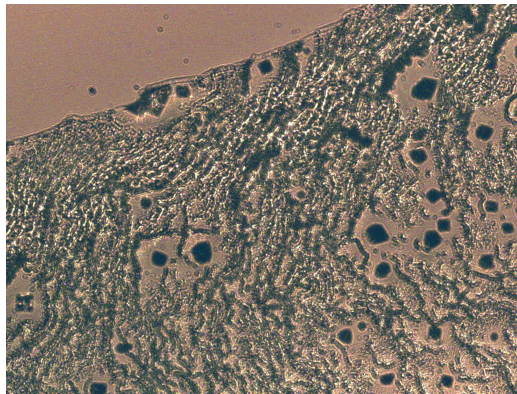


Figura 4.6: Patrón de difracción de restos de sal.

En conclusión podemos decir que gracias a la calibración de nuestro instrumento nos encontramos con la necesidad de tener muestras bien caracterizadas. Para lograr esto, lo más sencillo es trabajar con eritrocitos ya que son fáciles de conseguir y no se requiere una preparación minuciosa al momento de preparar la muestra que va a ser observada. En un primer intento es necesario observar a simple vista un glóbulo rojo tanto en un microscopio óptico como en nuestro microscopio sin lentes pero no es posible identificar al mismo debido a la diferencia en los campos de visión. A continuación se busca acotar el portaobjetos sobre el cual se han colocado las muestras pero al hacer esto no se tiene control alguno sobre la densidad de población de las muestras y se vuelve a caer en el primer problema. Asimismo se desecha la técnica de cortar el portaobjetos pues no es una opción viable para colocar una muestra, y más aún, sería demasiado complicado manipularla en nuestro microscopio sin lentes ya que se tendría que usar un segundo portaobjetos como soporte.

Por lo tanto se concluye que la mejor forma de aislar las células es diluyendo la disolución en la cuál se está preparando la muestra, y se debe de diluir tantas veces sea necesario siempre en función del número de células por unidad de volumen.



## Capítulo 5

# Programas de Cómputo Utilizados

Como se mencionó en los capítulos 3 y 4, para poder empezar a generar resultados fue imprescindible desarrollar un programa de simulación para determinar los tamaños de las células a partir de sus patrones de difracción. A continuación se describen brevemente los dos programas que se han utilizado para precisar los tamaños de las células con las que se realizaron pruebas con el microscopio sin lentes.

### 5.1. Programa para Generar Patrones de Difracción

El primer programa genera patrones de difracción de objetos sencillos tales como objetos circulares, elipsoidales y cuadrados. Como en principio este trabajo está más enfocado hacia el estudio de células en la sangre, el programa fue hecho para que de un modo más eficiente simule esas muestras:

1. Se simula una fuente de iluminación coherente tanto espacial como temporalmente con una longitud de onda  $\lambda = 633nm$ .
2. Se simula un sólo objeto de interés en la zona en la que se

denomina el plano de la muestra o plano celular. Para simular la célula se da la instrucción que el objeto, el cual está situado en el plano de la muestra, sea un objeto plano, circular uniforme y con una transmitancia de 0.5 y en el resto del plano 1. Cabe mencionar que este modelo es el que sugiere Ozcan [10]

3. La onda que proviene de la fuente de iluminación se hace incidir en el plano de las células pero tomando en cuenta que existe una refracción ya que ésta se presenta en el proceso, es decir, el algoritmo toma en cuenta una refracción puesto que la muestra esta colocada sobre un portaobjetos. Se utilizó un índice de refracción  $n = 1.5$
4. Después de que la onda incida sobre el objeto es cuando ocurre la difracción, para esta parte lo que se hace es resolver numéricamente la integral de difracción de Huygens-Fresnel que a continuación se expresa

$$U(P_0) = \frac{1}{i\lambda} \iint_{\Sigma} U(P_1) \frac{e^{ikr_{01}}}{r_{01}} \cos \theta \, ds \quad (5.1)$$

donde  $\theta$  es el ángulo entre el vector normal  $\hat{n}$  y el vector  $\vec{r}_{01}$  que apunta desde  $P_0$  hasta  $P_1$ ,  $k$  es la magnitud del vector de onda y  $\Sigma$  es la región de integración como se muestra en la Figura. Cabe mencionar que es un resultado exacto y no se hace uso de alguna aproximación.



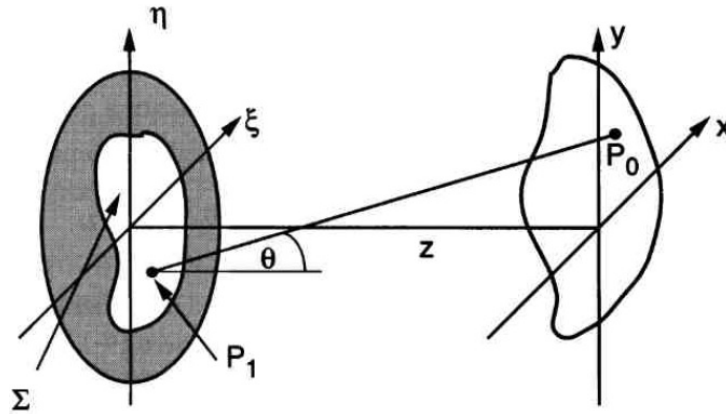


Figura 5.1: Geometría de la Difracción

5. Lo siguiente es generar el patrón de difracción en lo que denominamos el plano del detector CMOS.

En el último punto un parámetro es crítico, el que hemos denominado "zccd" en el algoritmo, y no es más que la distancia entre el plano del detector y el plano de las células. Es conveniente mencionar que en los artículos que se siguieron durante todo el proyecto [3], [4], [8] se hace gran énfasis en esta distancia ya que se estipula que sea controlada en intervalo desde  $1\mu m$  hasta apenas unos cuantos milímetros.

En la Figura 5.2 se puede apreciar un ejemplo de un patrón de difracción simulado por el programa arriba descrito. Para este patrón se usó una zccd de  $470\mu m$  y un tamaño de pixel del detector de  $2.2\mu m$ .

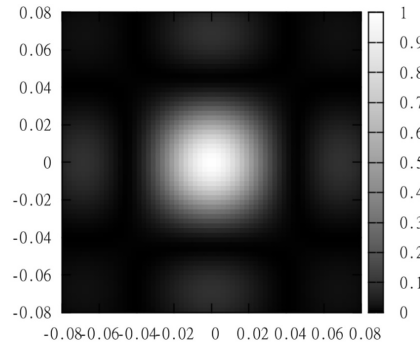


Figura 5.2: Patrón de difracción simulado por una célula de 4 micras y  $z_{ccd} = 470\mu m$

Como segundo ejemplo obsérvese la Figura 5.3. Podemos apreciar que aunque es el mismo parámetro (una célula de diámetro de 4 micras) existe una gran diferencia en el patrón simulado debido a que la distancia entre en plano del detector y el plano del objeto ( $z_{ccd}$ ) tiene una diferencia de 370 micrómetros.

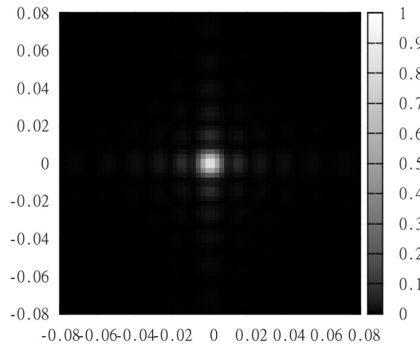


Figura 5.3: Patrón de difracción simulado por una célula de 4 micras y  $z_{ccd} = 100\mu m$

### 5.1.1. Determinación del diámetro de los Patrones de Difracción

Una vez que ya tenemos generado el patrón de difracción de cualquier célula que se quiera, se sigue la recomendación que el artículo sugiere: " El diámetro de la sombra se estima con el ancho del 10 % del máximo de la intensidad de la luz difractada en el

## 5.2. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL TAMAÑO DE LOS PATRONES DE DIFRACCIÓN

plano del detector", dicho en otras palabras, a la gráfica del patrón de difracción que hemos simulado se le hace un corte y obtendremos un perfil de irradiancia en el plano x-y, a este perfil se le hace un corte al 10 % y el ancho que se encuentre acotado entre los puntos de intesección y la curva de la irradiancia corresponderá a diámetro del patrón de difracción simulado. En la Figura 5.4 se muestra un ejemplo de los patrones de difracción típicos generados con nuestro programa y un ejemplo del método del 10 % de la irradiancia.

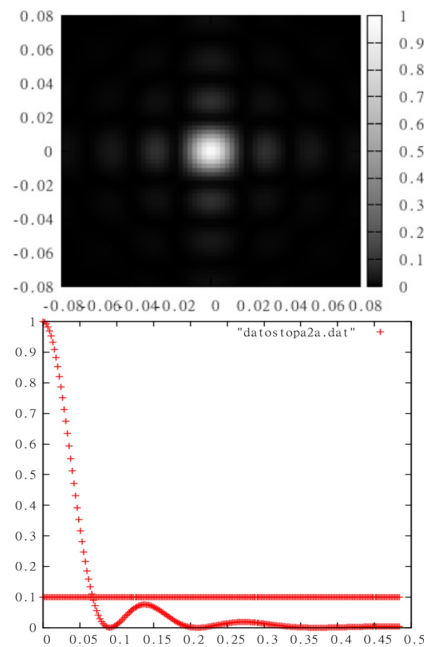


Figura 5.4: Arriba patrón de difracción simulado. Abajo perfil de Irradiancia con un corte al 10 %

## 5.2. Determinación Experimental del Tamaño de los Patrones de Difracción

Antes de mencionar el funcionamiento del segundo programa que se encarga de determinar de manera automatizada el tamaño de la célula, se detallará cómo es que de manera experimental ob-

tenemos el diámetro de los patrones de difracción de las muestras con las que trabajamos. Podemos enumerar 5 pasos:

1. Una vez que la muestra a estudiar esta preparada y colocada en el microscopio se utiliza cualquier aplicación de fotografía en el ordenador y se captura una foto en cualquier formato que se desee (.jpg, .bmp, entre otras)

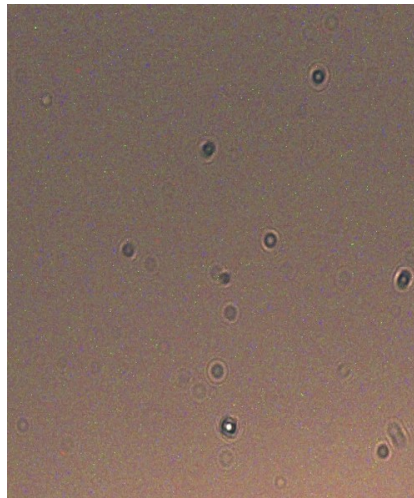


Figura 5.5: Foto de una Muestra

2. De la foto obtenida, se selecciona un patrón de difracción que se quiera estudiar y se recorta de la foto original.



Figura 5.6: Patrón Recortado

### 5.3. PROGRAMA PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE LA CÉLULA A TRAVÉS DEL PATRÓN

3. La imagen recortada se procesa y se obtiene la matriz de irradiancia (por lo general estas matrices no son mayores a 100x100).
4. Se grafica el renglón o la columna central de la matriz de irradiancia para obtener el perfil de irradiancia del patrón de difracción.
5. Se vuelve a utilizar el criterio del 10 % de la irradiancia con los ajustes necesarios.

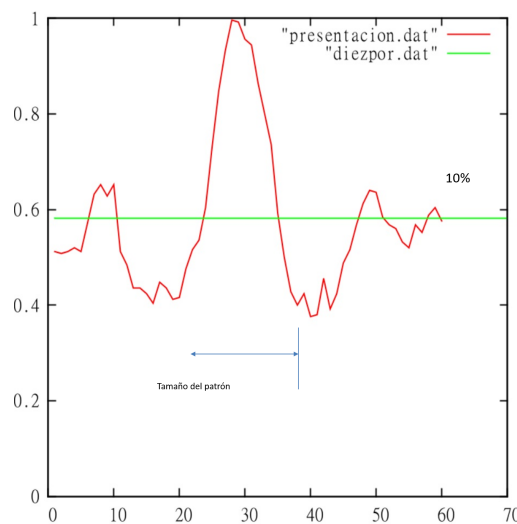


Figura 5.7: Perfil de Irradiancia de un patrón con un corte al 10 %

Finalmente, una vez que ya tenemos el tamaño experimental del patrón pasamos al siguiente programa.

### 5.3. Programa para Determinar el tamaño de la Célula a través del Patrón

Una vez que ya tenemos tanto el tamaño del patrón de difracción experimental como el simulado, se procede a hacer una comparación.

Para esto se desarrolló un programa, para trabajar con él es necesario hacer un banco de datos para diferentes diámetros de patrones de difracción y su correspondiente tamaño de célula. Esto es, con la ayuda del programa que simula patrones de difracción se obtienen diferentes tamaños, estos se obtienen al ir variando la distancia entre plano detector y plano celular (zccd), esta es la razón por la que ya ahora se puede afirmar que es un parámetro crítico debido a que un ligero cambio (del orden de centésimas de micras) nos va a generar diferentes valores al momento de estimar el tamaño a través del perfil de la irradiancia. Una vez que se ha creado el banco de datos se procede a comparar nuestro valor obtenido de modo experimental con todos aquellos datos que se encuentran en el banco. Para esto simplemente se hace una aproximación, se encuentran los dos valores entre los que se halle el valor experimental ( $Y_{sex}$ ) del tamaño del patrón de difracción, se traza una línea recta que pase por este valor; enseguida se traza otra línea recta por la cual pasen los dos valores que acoten a la  $X_{oex}$  y finalmente se encuentra la coordenada  $x$   $X_{oex}$  que representa el diámetro de la sombra al cual corresponde el diámetro del patrón de difracción experimental. Este proceso se ilustra en la Figura

5.8

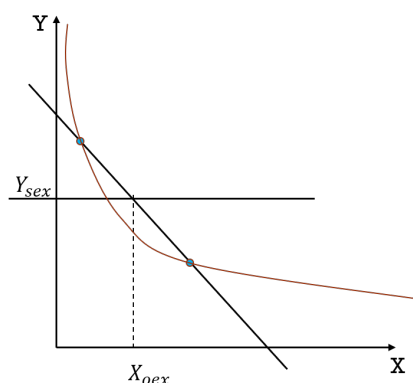


Figura 5.8: Aproximación mediante rectas para determinar tamaño de las células

### 5.3. PROGRAMA PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE LA CÉLULA A TRAVÉS DEL PATRÓN

En el apéndice D se muestra los códigos en Fortran utilizados de los programas arriba mencionados.

En conclusión, con estos programas y la forma de determinar el tamaño de los patrones de difracción se tuvieron los elementos necesarios y suficientes para obtener los resultados. Estos resultados se van a limitar únicamente a objetos planos circulares. El primer programa es la base de nuestro instrumento, ya que sirve como principio de modelación de los objetos que vamos a observar y es gracias a este que podemos determinar los tamaños de las células mediante sus patrones de difracción. Por otra parte el segundo programa sólo sirve como método de optimización para automatizar el proceso de hacer la comparación entre las diferentes simulaciones.





# Capítulo 6

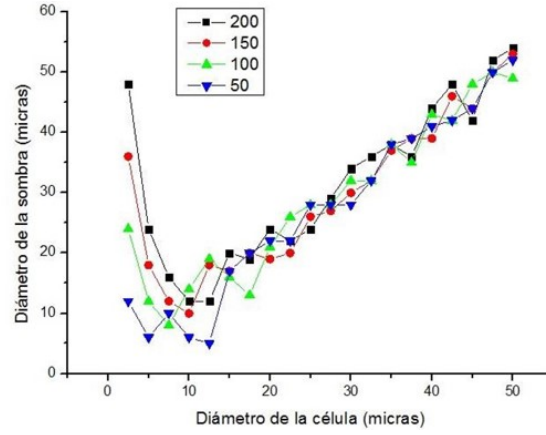
## Resultados

A lo largo de este último capítulo se exponen los resultados finales que obtuvimos al trabajar con distintas muestras observadas en el Microscopio Holográfico Digital sin Lentes así como simulaciones hechas. En la sección [6.1](#) mediante una comparación de curvas mostramos que experimentalmente hemos llegado a los mismos resultados que son reportados en el artículo a seguir. Para finalizar, en las secciones posteriores se muestran los resultados que obtuvimos al determinar los tamaños de diferentes muestras, comenzando con rejillas de Ronchi, continuando con eritrocitos diluidos una vez, eritrocitos sin diluir y culminamos con los eritrocitos que fueron diluidos cinco veces. Todos los resultados fueron obtenidos al utilizar los programas anteriormente descritos en el capítulo [5](#) y utilizando el método descrito en la subsección [5.1.1](#)

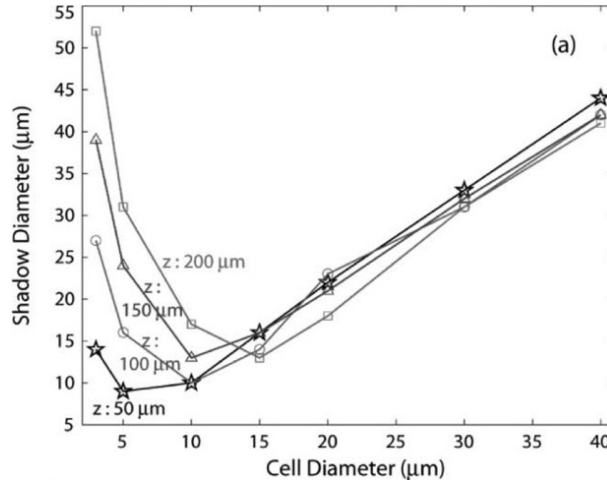
### 6.1. Resultados de Simulación Similares

Como se ha explicado antes, el parámetro crítico de nuestro sistema tanto en el experimento como en la simulación, es la distancia de separación que existe entre el plano del detector y el plano de las células (zccd). Ya hemos mencionado que al variar esta distancia muy poco (del orden de micrómetros) obtenemos diferentes valores. Por ejemplo, si simulamos una célula con un

diámetro de  $7.62\mu m$  (tamaño promedio de un glóbulo rojo) a una distancia zccd de  $470\mu m$  obtenemos un patrón de difracción de  $35.19\mu m$  de diámetro. Por otra parte, si esa misma célula la simulamos nuevamente pero con una distancia zccd de  $500\mu m$ , se obtiene un patrón de difracción con un diámetro de  $37.64\mu m$ . A continuación, en la Figura 6.1(a) se presenta una gráfica que nos muestra el "Tamaño de la sombra" en función del "Tamaño de la célula". Para crear esta gráfica tomamos diferentes diámetros de células que van desde  $2\mu m$  hasta  $50\mu m$  con un intervalo de incremento de 0.5, además se realizaron las simulaciones para distancias zccd de 50, 100, 150 y  $200\mu m$ . Por otra parte, en la figura 6.1(b) podemos observar la gráfica que nos reporta el artículo de Ozcan [10] que seguimos.



(a) Gráfica Obtenida



(b) Gráfica Reportada

Figura 6.1: Comparación de resultados reportados por Ozcan[10] y resultados simulados para esta tesis.

Existen algunos aspectos que son de interés mencionar: La relación entre el diámetro de la sombra y del objeto no es unívoca ya que aparecen dos comportamientos. Claramente las curvas parecen dividirse en dos partes; la primera es una curva de tipo decaimiento inverso al tamaño de la célula mientras que la segunda es una curva lineal con el mismo. Por nuestra experiencia al trabajar podemos afirmar que la parte lineal es el campo de la óptica geométrica, mientras que el decaimiento corresponde a

la óptica física (difracción); como no estamos interesados en la parte de la óptica geométrica no es de nuestro interés trabajar con objetos que están en ese rango, como los parásitos o microesferas cercanas a  $100\mu m$ ; no obstante no hay un valor fijo para mencionar que a partir de ese punto ya no podemos trabajar pues como se puede observar en las gráficas, el máximo que nos estaría indicando el punto umbral entre la óptica física y geométrica no siempre es el mismo, pero nos da una buena aproximación de con qué objetos no es muy adecuado trabajar; sin embargo, en nuestro caso al trabajar con eritrocitos no hay problema alguno ya que están al rededor de  $7.5\mu m$ . Podemos notar que aunque trabajamos de diferente manera hemos llegado a resultados muy similares en comparación a las gráficas que nos reportan en el trabajo. Esto nos dio una idea que estabamos obteniendo resultados válidos y nos permitió seguir en nuestra línea de investigación.

## 6.2. Rejillas de Prueba de Ronchi

Como un primer trabajo se usaron como muestras rejillas de prueba de Ronchi de diferente periodo que fueron de 5,10,20,30,40,50 y 3000 l/mm. En el cuadro 6.1 están los resultados.

| Rejilla<br>(Lp/mm) | $\nu$<br>( $\mu m$ ) | Ancho Mic.<br>óptico ( $\mu m$ ) | Tamaño sombra<br>Mic. 2 ( $\mu m$ ) |
|--------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 5                  | 100                  | 100.99                           | 82.16                               |
| 10                 | 50                   | 51.56                            | 44.61                               |
| 20                 | 25                   | 26.67                            | 21.28                               |
| 30                 | 16.6                 | 18.49                            | 17.73                               |
| 40                 | 12.5                 | 13.71                            | 22.93                               |
| 50                 | 10                   | 10.795                           | 16.02                               |
| 3000               | 0.16                 | -                                | 76.9                                |

Cuadro 6.1: Datos Rejillas de Ronchi. Mic. 2 hace alusión a la segunda versión del Microscopio

Se puede observar en una primera inspección que para las rejillas de 5, 10 y hasta la de 20 l/mm se obtienen buenos resultados ya que prácticamente se obtienen los mismos resultados que arroja el microscopio óptico, en particular para las rejilla de 20 l/mm. No obstante, hay que recordar de la sección anterior que al momento de obtener relaciones lineales estamos trabajando en la parte de la óptica geométrica, entonces gracias a esa aseveración se llegó a la conclusión de que a partir de la rejilla de 30 l/mm se estaría trabajando en la zona de difracción y es en realidad la parte que nos interesa. Sin embargo, es más complicado obtener buenos resultados justo a partir de esa rejilla por lo cual se decidió continuar con los experimentos pero con células de la sangre.

En conclusión podemos decir que al trabajar con las rejillas de prueba de Ronchi hemos encontrado la parte lineal que es lo que indica la óptica geométrica y esto se puede apreciar bien para las rejillas de 5, 10, 20 y 30 l/mm ya que para estas cuatro rejillas, prácticamente el ancho medido en el microscopio óptico es casi el

mismo que se encontró para el tamaño de sombra usando nuestro microscopio óptico (Ver cuadro [6.1](#)). No obstante, con las rejillas de prueba de Ronchi existe una dificultad; según lo esperado es que las rejillas de 40 y 50 nos arrojaran ya patrones de difracción muy grandes (ya que tienen un ancho de  $10\mu m$  que justamente es el tamaño de los glóbulos rojos) pero los resultados experimentales nos están diciendo que para esas rejillas los patrones difracción tienen un tamaño de sombra más pequeño que las rejillas cuyo ancho es de 100 o  $50\mu m$ , es decir como si estuviésemos aún en la zona de la óptica geométrica.

Por otro lado, si hablamos de la rejilla de 3000 l/mm notamos que ha empezado a crecer el tamaño de la sombra, pero aún no supera siquiera al tamaño de la sombra de la rejilla de 5l/mm. En los artículos que se siguieron a lo largo de este trabajo de investigación [2], [3], [4], [8] no se reportan resultados obtenidos con rejillas de prueba de Ronchi, sólo resultados para objetos circulares, posiblemente porque estemos ante otro efecto de la difracción que no se ha considerado como podría ser la variación de la anchura del patrón de difracción debido a la diferente geometría del objeto a observar o la variación de la anchura del spot con la distancia del detector. Por lo tanto, se decidió que sólo se trabajará con eritrocitos, microesferas controladas y no se seguirá la corriente de las rejillas de prueba de Ronchi ni de BiRonchi.

### 6.3. Calibración con microesferas de $SiO_2$

Antes de continuar con nuestros resultados, se tomó la idea de calibrar nuestro Microscopio Holográfico Digital sin lentes utilizando microesferas de dióxido de silicio cuyo tamaño oscilaba entre  $9\mu m$  y  $13\mu m$ ; al tener muestras de un tamaño controlado y ya conocido podemos estimar la distancia que debe existir entre el plano de las células y el plano del detector, ya que esta se puede ir variando hasta obtener el valor deseado. Ésta muestra de micro-

esferas se diluyó de la forma  $1\text{mg/ml}$  en agua desionizada y para obtener una mezcla homogénea se utiliza un sonicador (emisor de ultrasonidos) En la Figura 6.2 se pueden observar los patrones de difracción con los que se decidió trabajar. Cabe destacar que una vez más se pueden apreciar lo que posiblemente se trate de objetos de fase los cuales no pueden ser percibidos al observar la muestra en un microscopio óptico. Para obtener resultados, lo primero que hicimos fue medir con un microscopio óptico convencional 20 microesferas, llegando a la conclusión que el tamaño promedio de esas esferas es de  $11.7665\mu\text{m}$ , con una desviación estándar dada por  $\sigma = 1.44076$ . Enseguida, se procedió a determinar el tamaño experimental de 20 patrones de difracción de la Figura 6.2 dando como resultado un promedio de  $24.9245\mu\text{m}$ . Finalmente, simplemente se varió la distancia  $z_{\text{ccd}}$  en nuestro programa que simula patrones de difracción hasta lograr que ese tamaño promedio de objeto ( $11.7665\mu\text{m}$ ) genere el tamaño promedio de los patrones de difracción hallados de modo experimental ( $24.9245\mu\text{m}$ ). Por lo tanto podemos concluir que la distancia de calibración  $z_{\text{ccd}}$  es de  $499\mu\text{m}$ . En el cuadro 6.2 se muestran resultados.



Figura 6.2: Patrones de difracción de microesferas de dióxido de silicio

| Patrón | Tamaño Sombra ( $\mu m$ ) | Tamaño Objeto ( $\mu m$ ) |
|--------|---------------------------|---------------------------|
| 1      | 23.75                     | 12.33                     |
| 2      | 23.58                     | 12.41                     |
| 3      | 28.72                     | 10.04                     |
| 4      | 25.05                     | 11.62                     |
| 5      | 24.77                     | 11.81                     |
| 6      | 23.94                     | 12.25                     |
| 7      | 26.32                     | 10.92                     |
| 8      | 23.78                     | 12.32                     |
| 9      | 25.35                     | 11.43                     |
| 10     | 24.05                     | 12.20                     |
| 11     | 23.57                     | 12.42                     |
| 12     | 24.67                     | 11.87                     |
| 13     | 23.22                     | 12.59                     |
| 14     | 27.19                     | 10.58                     |
| 15     | 25.40                     | 11.40                     |
| 16     | 27.02                     | 10.65                     |
| 17     | 22.36                     | 13.07                     |
| 18     | 23.71                     | 12.35                     |
| 19     | 24.04                     | 12.20                     |
| 20     | 28.00                     | 10.29                     |

Cuadro 6.2: Datos de microesferas de Dióxido de Silicio.

Como dato final podemos ver que el tamaño promedio obtenido con nuestro microscopio sin lentes es de  $11.74249\mu m$  que está dentro del rango del tamaño promedio en el que se supone se encontraban tales microesferas. Además, nótese que es exactamente el tamaño promedio obtenido con el microscopio óptico variando únicamente sólo por 0.02401, con esto concluimos que nuestra calibración es consistente y en el trabajo subsecuente ya no será



necesaria una nueva calibración

## 6.4. Eritrocitos Diluidos

En la Figura [6.3](#) se muestra una fotografía de la muestra con la que se trabajó.

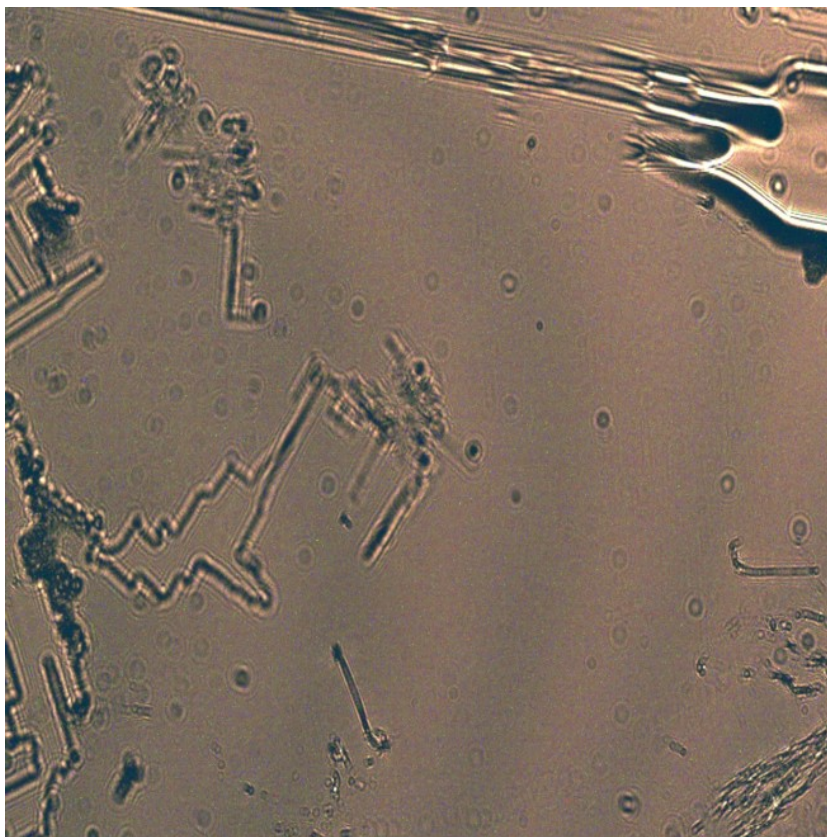


Figura 6.3: Muestra de Eritrocitos Diluidos

La tabla [6.3](#) muestra los resultados obtenidos cuando trabajamos con eritrocitos los cuales fueron diluidos en una sola ocasión mediante el método descrito en la sección [4.2.4](#). Como era de esperarse los resultados fueron mucho mejores que los que se obtuvieron con las rejillas de prueba de Ronchi pues objetos pequeños

están generando sombras o patrones de difracción grandes y esto era lo que se esperaba además de que ya teníamos calibrado nuestro instrumento.

| Sombra ( $\mu m$ ) | Tamaño del objeto ( $\mu m$ ) |
|--------------------|-------------------------------|
| 35                 | 8.18                          |
| 36.31              | 7.88                          |
| 39.68              | 7.20                          |
| 37.42              | 7.64                          |
| 41.06              | 6.94                          |
| 35.93              | 7.97                          |
| 38.14              | 7.49                          |
| 30.89              | 9.27                          |

Cuadro 6.3: Datos de eritrocitos usando  $z_{ccd} = 499\mu m$

Por lo tanto concluimos que el tamaño promedio de los eritrocitos diluidos observados en el Microscopio Holográfico Digital sin Lentes es de:  $7.82125\mu m$ .

## 6.5. Eritrocitos sin Diluir

A continuación, en la Tabla [6.4](#) mostramos los resultados que obtuvimos al trabajar en la orilla del portaobjetos (Fig. [6.4](#)) donde hay una menor densidad de población de células.



Figura 6.4: Muestra de Eritrocitos sin Diluir

| Sombra ( $\mu m$ ) | Objeto ( $\mu m$ ) |
|--------------------|--------------------|
| 40.93              | 6.96               |
| 40.36              | 7.07               |
| 40.64              | 7.01               |
| 34.21              | 8.37               |
| 45.02              | 6.32               |
| 36.66              | 7.81               |
| 40.42              | 7.06               |
| 43.94              | 6.47               |
| 35.96              | 7.96               |
| 28.03              | 10.28              |

Cuadro 6.4: Datos de eritrocitos usando  $zccd = 499\mu m$ 

Como podemos observar en esta ocasión obtenemos un tamaño promedio de eritrocitos de  $7.531\mu m$ . Es bien sabido que un histograma es una gráfica de barras que representa una distribución de frecuencia de una variable cuantitativa. En nuestro caso

la variable será nuestro tamaño de objeto; así pues tenemos una referencia estadística del promedio de células que se midieron.

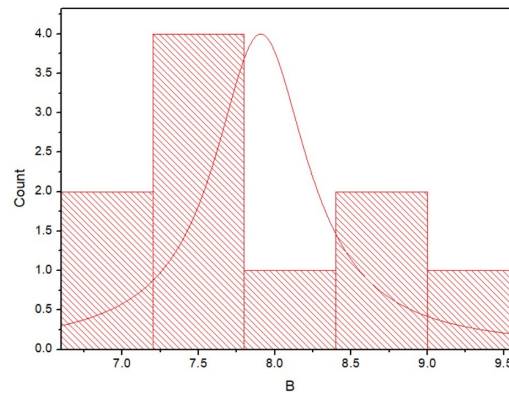


Figura 6.5: Histograma del tamaño de células sin diluir

## 6.6. Eritrocitos diluidos cinco veces

Ahora mostramos los resultados obtenidos al utilizar como muestra una gota de sangre que se diluyó un total de cinco veces para poder identificar células más fácilmente

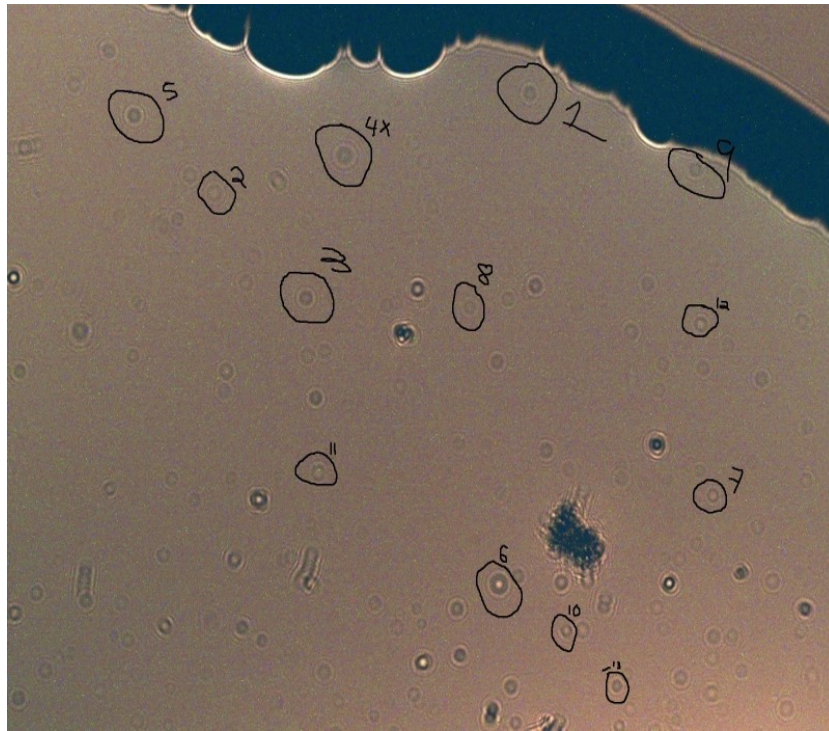


Figura 6.6: Eritrocitos Diluidos cinco veces 1:100000

| Patrón | Sombra ( $\mu m$ ) | Objeto ( $\mu m$ ) |
|--------|--------------------|--------------------|
| 1      | 33.16              | 8.63               |
| 2      | 50.55              | 5.65               |
| 3      | 32.29              | 8.87               |
| 5      | 32.29              | 8.87               |
| 6      | 35.44              | 8.08               |
| 7      | 39.31              | 7.27               |
| 8      | 42.74              | 6.66               |
| 9      | 33.19              | 8.62               |
| 10     | 25.74              | 11.21              |
| 11     | 36.94              | 7.75               |
| 12     | 40.23              | 7.09               |
| 13     | 22.65              | 12.90              |

Cuadro 6.5: Datos de eritrocitos muy diluidos usando  $z_{ccd} = 499\mu m$



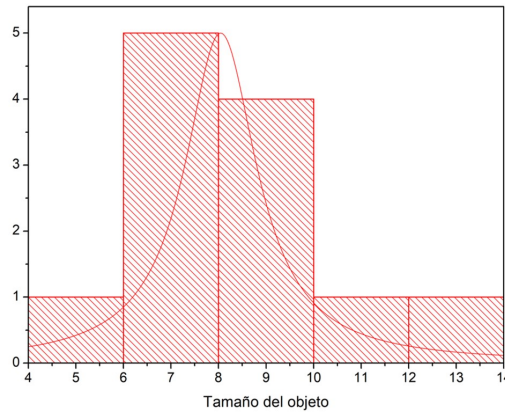


Figura 6.7: Histograma células diluidas cinco veces

Nuevamente gracias al histograma podemos darnos cuenta que el valor promedio del diámetro de las células con la que se trabajó recae en el valor  $8\mu m$  de esto podemos volver a concluir que son resultados consistentes con lo que esperábamos.

Para concluir este capítulo podemos afirmar que:

- Hemos sido capaces de obtener resultados similares a los de Ozcan [10]; esto confirma que todos los demás resultados están fundamentados en una teoría que ha sido expuesta con anterioridad.
- No es factible trabajar con las rejillas de prueba de Ronchi puesto que se obtienen resultados desfavorables para nosotros. Es posible que estos resultados difieran de lo que se esperaba porque estamos trabajando con una estructura de difracción (varias rendijas) y no sólo con un objeto difractor como lo son en los otros ejemplos los eritrocitos o las microesferas.
- No es posible trabajar con muestras de sangre (en particular eritrocitos) que no han sido diluidas apropiadamente. Debido a la superposición de los patrones de difracción no es posible trabajar con el objeto que se desea estudiar; por lo

tanto siempre nos debemos de asegurar que en la muestra los objetos aparezcan en una baja densidad de población.

- Nuestra variable  $z_{ccd}$  es un parámetro crucial ya que éste sirve para determinar el diámetro de los objetos que generan los patrones de difracción que se han obtenido experimentalmente. Pese a que es una variable que nosotros no podemos controlar, nuestra forma implícita de determinar esta distancia ha arrojado buenos resultados los cuales son consistentes al momento de realizar una comparación con un microscopio óptico; no obstante si se requiere aún más precisión se podría trabajar con objetos cuyo tamaño sea ya conocido y sea único y así volver a hacer la calibración de la distancia  $z_{ccd}$ .





## Capítulo 7

### Conclusiones

En la presente tesis se han discutido los elementos básicos de la teoría de holografía sin lentes, la construcción de un microscopio holográfico digital sin lentes en dos distintas versiones y se han especificado sus elementos principales e indispensables para su funcionamiento. Además hemos discutido sobre cuáles son las muestras más eficientes para ser analizadas con nuestro microscopio así como la mejor manera en la que uno mismo puede prepararla. También hemos mostrado los programas de cómputo que han sido usados en el análisis de las muestras y para finalizar se han mostrado diversos resultados que se obtuvieron a lo largo de toda la tesis.

Respecto a la creación del instrumento hemos sido capaces de construir dos microscopios sin lentes los cuales ya funcionan; además hemos otorgado una serie de pasos con especificaciones detalladas para poder reproducir un microscopio holográfico digital sin lentes. En resumen, ambas versiones necesitan los tres elementos básicos los cuales son un sensor CMOS, un LED y un pinhole. La principal diferencia entre las dos versiones de microscopios es el tamaño de pixel del sensor CMOS y como segunda diferencia la manufactura, sin embargo el principio de funcionamiento sigue siendo el mismo. Por lo que respecta al LED no es necesario usar uno de alta luminosidad y/o potencia pues no afecta en algo a

la teoría escalar de la difracción ya que su función es garantizar la coherencia espacial y temporal de manera individual en cada célula; más aún no importa de que color sea el LED siempre y cuando esté dentro del espectro de emisión visible y finalmente el pinhole se pudo construir con la técnica de las agujas mostrada anteriormente pues sólo necesitamos pinholes de unas cuantas decenas de micras y no menos.

En lo que concierne a la preparación de muestras podemos decir las siguientes conclusiones: hasta ahora, las muestras con las que se quiera trabajar deben tener una transmitancia distinta de 1. Existe un gran problema al momento de observar muestras y es que al tener un gran campo de visión se observará una vasta densidad de población de células (o de lo que se esté observando) y los patrones de difracción se superpondrán impidiendo un buen análisis de los objetos. Hemos ya resuelto este problema y podemos afirmar que la mejor manera de evadirlo no es otro más que diluir la muestra las veces que sea necesario hasta tener pocos objetos en nuestro campo de visión. Por otro lado, el tamaño de las muestras siempre debe estar preferiblemente dentro de un rango  $[0, 40]$  micras (independientemente de la distancia del sensor al plano de la muestra) ya que al sobrepasar este rango estaríamos ante la óptica geométrica y no es nuestro campo de interés. Respecto al trabajo con microesferas también llegamos a la conclusión de que nuevamente es necesario trabajar con bajas densidades de población. Otra conclusión es que las rejillas de prueba de Ronchi por el momento no son factibles para usarlas con el microscopio sin lentes debido a que lo más probable es que exista un efecto difractivo diferente al que aparece cuando trabajamos con objetos circulares o esféricos aislados y por tanto nuestro modelo no es compatible.

Respecto al programa que se usa para generar los patrones de difracción una vez más hacemos hincapié en que la base del algoritmo es la resolución numérica de la integral de Huygens-Fresnel

y nunca se hace uso de alguna aproximación. El parámetro crítico al que se debe poner gran énfasis es a la distancia  $z_{ccd}$  ya que es una variable que determinará el tamaño de los patrones de difracción así como del objeto en cuestión. Como se mencionó antes, el algoritmo es indispensable para este proyecto ya que es de lo que nos valemos para pasar del enfoque cualitativo a uno cuantitativo; y esto lo podemos apreciar en la sección de resultados cuando presentamos los diferentes tamaños de muestras tales como eritrocitos, microesferas y las rejillas de prueba de Ronchi.

Según el objetivo planteado, el cual era la construcción del Microscopio Holográfico Digital sin Lentes así como su calibración y posteriormente la caracterización de las muestras con fotografías obtenidas directamente del microscopio y junto con la ayuda de algún algoritmo y basándonos en los resultados obtenidos, podemos concluir que el objetivo se ha logrado.



## Apéndice A

# El Microscopio Óptico

Un observador puede hacer que un objeto se vea más grande simplemente acercándolo más a su ojo. A medida que el objeto se aproxima, su imagen en la retina aumenta, permaneciendo en foco hasta que el cristalino ya no podrá proporcionar la acomodación adecuada. Si el objeto se mueve más allá de esta “distancia mínima de visión”, a veces también llamada punto próximo; la imagen se hará borrosa. Un microscopio óptico es un sistema de lentes que produce una imagen virtual.

Podemos hacer dos clasificaciones del microscopio óptico que son el microscopio óptico simple y el microscopio óptico compuesto. A continuación, se analizarán dichas configuraciones.

### A.1. El Microscopio óptico Simple

Un microscopio óptico simple es el más sencillo tanto para estudiar como para su funcionamiento y es aquel que está conformado por una sola lente convergente, llamada comúnmente lupa. En efecto se puede usar una única lente para aumentar el poder de refracción del ojo, de tal modo que un objeto pueda acercarse más allá de la distancia mínima de visión preservando el tamaño angular del mismo. Por lo que es equivalente a observar el objeto

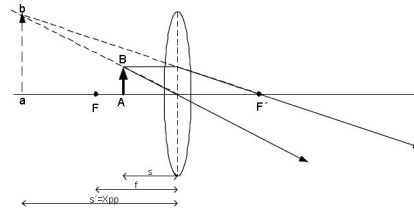


Figura A.1: Microscopio Simple

muy cerca del ojo, pero enfocado. En la figura [A.1](#) se muestra un esquema donde se ha hecho el trazo de rayos para una lupa, donde el foco se coloca entre el foco y la lente.

En la figura [A.1](#), el objeto AB se coloca entre la lente y el foco F de modo que la imagen es virtual y está a una distancia  $s'$  igual al punto próximo  $x_{pp}$ . La amplificación  $M_a$  de un instrumento visual se define como la relación entre el tamaño de la imagen en la retina cuando se ve a través del instrumento y el tamaño de la imagen en la retina cuando se ve con el ojo sin ayuda de la lente a la distancia mínima de visión. La amplificación de una lupa se define como  $M = \beta/\alpha$ , donde  $\beta$  y  $\alpha$  son los ángulos formados por los rayos principales por la parte superior del objeto en los casos de ojo sin lente [A.2](#) y ojo con lente figura [A.3](#) respectivamente.

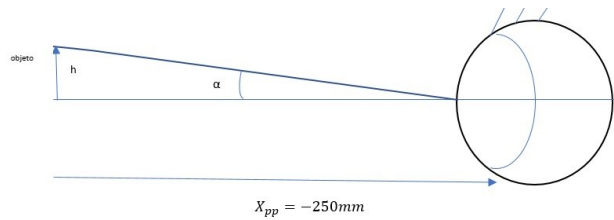


Figura A.2: Ojo sin lente

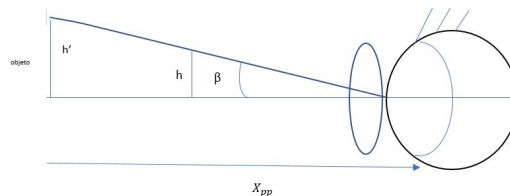


Figura A.3: Ojo con lente

De las figuras [A.2](#) y [A.3](#) se obtiene respectivamente:

$$\beta = \frac{h}{l} \quad (\text{A.1})$$

y

$$\alpha = -\frac{h}{x_{pp}} \quad (\text{A.2})$$

$$M_a = -x_{pp} \left( \frac{1}{l_{imcl}} - \frac{1}{f_{lupa}} \right) \quad (\text{A.3})$$

y de la fórmula de Gauss;

$$\frac{1}{l} = \frac{1}{l'} - \frac{1}{f} \quad (\text{A.4})$$

se tiene finalmente:

$$m = 1 + \frac{250}{f} \quad (\text{A.5})$$

En caso de ampliaciones altas,  $M_{lupa} = \frac{250mm}{f_{lupa}}$

## A.2. Oculares

Cuando nos referimos a oculares, hablamos de un instrumento óptico visual. Básicamente se trata de una lupa cuya función no es ver un objeto físico real, sino más bien la imagen intermedia de ese objeto, formado por el sistema de lentes que lo procede. En realidad, lo que nuestro ojo mira es al ocular y el ocular mira en el sistema óptico, por ejemplo, un microscopio compuesto. Una lente simple es el caso más sencillo de un ocular. sin embargo, la calidad de la imagen no será muy buena. Con esto nos referimos a que, si queremos conseguir una imagen en la retina más satisfactoria, el ocular casi no debe tener aberraciones. El ocular de un instrumento especial, no obstante, puede diseñarse como parte

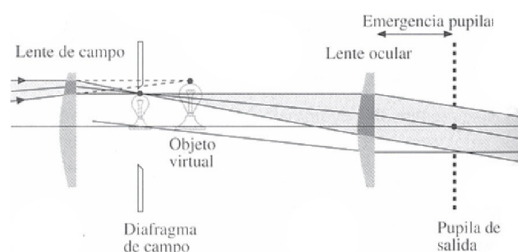


Figura A.4: Ocular de Huygens

integrante del sistema completo, de tal manera que sus lentes se puedan utilizar de modo tal que se compensen las aberraciones, esto es, el ocular puede estar constituido por un conjunto de varias lentes. Los oculares son además muy difíciles de diseñar y la técnica más usual es ir modificando ligeramente algunos diseños prediseñados. El ocular debe proporcionar una imagen virtual (de la imagen intermedia) para que pueda ser vista cómodamente por un ojo normal y relajado. Asimismo, debe determinar la posición del centro de la pupila de salida en donde el ojo del observador debe colocarse, preferiblemente a una distancia de 10 mm de la última superficie. Como se vio anteriormente, el aumento del ocular es  $M_a = (250\text{mm})/f$ . El ocular de Huygens que data de hace más de 250 años se sigue utilizando aun extensamente hoy en día, especialmente en microscopía. La lente adyacente al ojo se denomina lente ocular mientras que la primera lente en el ocular es la lente de campo. La distancia desde la lente ocular hasta el punto ocular recibe el nombre de emergencia pupilar que en el ocular de Huygens es tan sólo de 3 mm. Cabe observar que para este ocular los rayos entrantes tienen que ser convergentes de tal manera que formen un objeto virtual para la lente ocular.

Otro recurso de confianza es el ocular de Ramsden en donde el foco principal se halla enfrente de la lente de campo y así la imagen intermedia aparecerá ahí en un acceso fácil y donde se colocaría un retículo que podría contener una serie de hilos, escalas de precisión, etc. Ya que el retículo y la imagen intermedia se



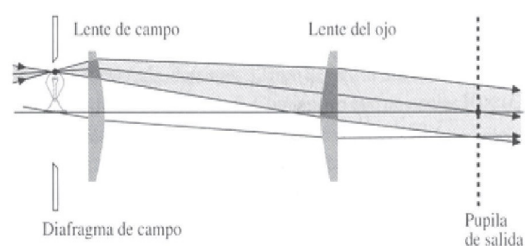


Figura A.5: Ocular de Ramsden

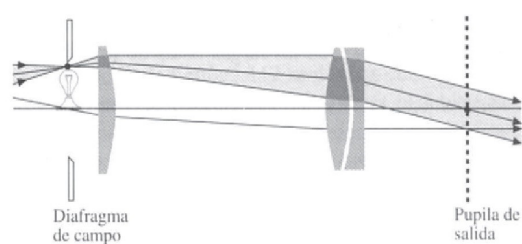


Figura A.6: Ocular de Kelner

hallan en el mismo plano, ambos estarán en foco al mismo tiempo. La emergencia pupilar de unos 12 mm es una ventaja sobre el ocular anterior. El ocular de Ramsden es relativamente conocido y bastante barato.

El ocular de Kellner proporciona un aumento indiscutible de la calidad de la imagen si bien su emergencia pupilar se sitúa a medio camino entre la de los dos sistemas anteriores. El de Kellner es esencialmente un ocular de Ramsden acromatizado que se utiliza a menudo en instrumentos telescópicos de campo ancho, gran aumento y gran emergencia pupilar.

El ocular de Erfle es probablemente el ocular de campo ancho más común (aproximadamente  $\pm 30^\circ$ ). Está bien corregido para todas las aberraciones y es comparativamente caro.

Si bien hay muchos más oculares, incluyendo oculares zoom de potencia variable y unos con superficies asféricas, los que ya hemos examinado son los más representativos.

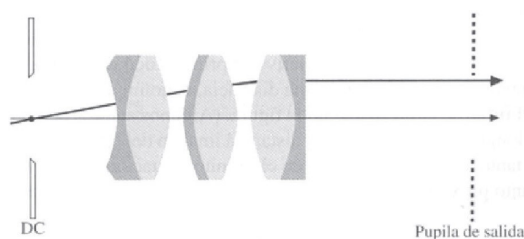


Figura A.7: Ocular de Erfle

### A.3. Microscopio Óptico Compuesto

El microscopio compuesto nos proporciona una amplificación de un objeto que va más allá de la que nos proporciona una lupa. La figura [A.8](#) ilustra la versión más simple de los primeros sistemas de microscopios compuestos.

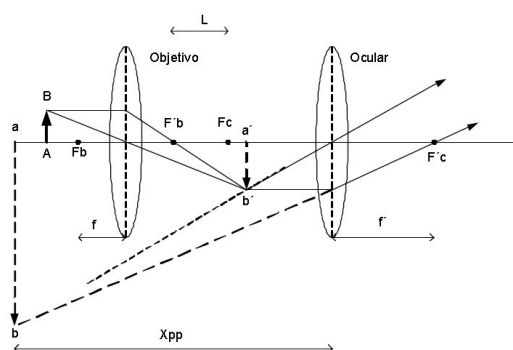


Figura 6.24. Microscopio compuesto

Figura A.8: Microscopio Compuesto

El sistema de lentes que se halla más cerca del objeto a estudiar detalladamente recibe el nombre de objetivo, en la figura se representa por una sola lente. Esta primera lente, forma una imagen real del objeto, invertida y generalmente aumentada que se encontrará antes del ocular, que es la segunda lente del sistema. Los rayos que divergen de cada punto de esta imagen emergerán del ocular paralelos el uno al otro. La función del ocular es aumentar la imagen intermedia aún más. La amplificación proporcionada

por el objetivo será  $m = \frac{l'_{ob}}{l_{ob}}$ . Entonces para la amplificación total de nuestro sistema tendremos como resultado final:

$$M_{tot} = M_{ob}M_{oc} \quad (A.6)$$

y como ya sabemos, en general  $M = \frac{s'}{s}$ . Por fines de fabricación la distancia del segundo foco del objetivo al primer foco del ocular se ha estandarizado en 160 mm. Dicha distancia se denomina longitud del tubo, se indica con L en la figura [A.8](#). Algunos autores definen la longitud del tubo como la distancia desde el plano principal del objetivo hasta la imagen, es decir, Por consiguiente, la amplificación del objetivo está dada por:

$$M_{ob} = \frac{h'_{ob}}{h_{ob}} = \frac{s'_{ob}}{s_{ob}} = \frac{160mm}{s_{ob}} \quad (A.7)$$

Volviendo a utilizar la fórmula de Gauss para lentes y despejando  $s_{ob}$  tendremos como resultado final  $M_{ob} = 1 - \frac{160mm}{f_{ob}}$ . Recordando que en caso de amplificación alta el punto estándar establecido es de 250mm tendremos una amplificación total dada por:

$$M_{tot} = \left( -\frac{160}{f_{ob}} \right) \left( \frac{250}{f_{ac}} \right) \quad (A.8)$$



## Apéndice B

### Antecedentes de la Holografía

Se sabe que la aberración esférica de lentes es una limitación que resolver en la potencia de microscopios electrónicos alrededor de  $5\text{\AA}$ . Se han hecho algunas sugerencias, pero por sí mismas son difíciles y las expectativas de mejorar disminuyen aún más por el hecho de que la resolución límite es proporcional a la raíz cuarta de la aberración esférica. Por ello, una mejoría de la resolución en un decimal requeriría una corrección del objeto en cuatro decimales, prácticamente una tarea imposible.

El principio microscópico de Gabor descrito a continuación ofrece una solución a dicho problema, ya que se nos permite eximir totalmente de objetivos electrónicos. Las micrografías, por análisis electrónico, se obtienen en un proceso de dos etapas, seguido de una síntesis óptica, como en “Microscopio de rayos-x” de Sir Lawrence Bragg. No obstante, mientras que “Microscopio de rayos-x” se aplica sólo a casos muy particulares, en los que las fases son conocidas de antemano, el principio de Gabor ofrece una detección completa de amplitudes y fases en un solo diagrama y se puede aplicar a objetos arbitrarios, no solo a casos particulares. La figura [B.1](#) es una explicación general del principio.

El objeto es iluminado por un haz de electrones interpuesto como un foco fino del cual éste diverge a un semi-ángulo  $\alpha$ . Se asegura suficiente coherencia si el diámetro nominal o Gaussiano

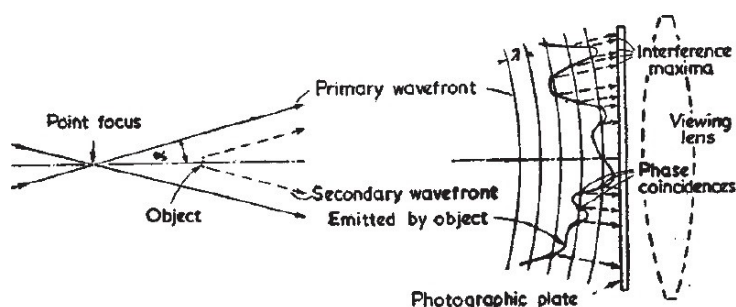


Figura B.1: Interferencia entre una onda de iluminación homocéntrica y la segunda onda emitida por un objeto pequeño.

del foco es menor que la resolución límite,  $\lambda/2 \sin \alpha$ . El diámetro físico, determinado por difracción y aberración esférica del sistema de iluminación, puede ser mucho mayor. El objeto está a una distancia pequeña detrás (o enfrente) del punto foco, seguido por una placa fotográfica situado a una distancia que es un múltiplo grande de la distancia del objeto al foco. Así, el arreglo es similar a un microscopio de sombra de electrones, pero éste es usado en un rango donde el microscopio de sombra es inútil ya que produce imágenes muy distintas a la original. De preferencia el objeto debe ser más pequeño que el área iluminada en el plano objeto y debe ser montado sobre un soporte el cual transmita una porción apreciable de la onda primaria. La detección se lleva a cabo por la interferencia de la onda primaria con la parte coherente de la onda secundaria emitida por el objeto. Puede demostrarse que, al menos en las partes exteriores del diagrama, la interferencia máxima se forma muy cerca de donde las fases de las ondas primaria y secundaria han coincidido como se muestra en la figura **B.1**.

Si esta fotografía se desarrollara a la inversa, o se imprimiera a la inversa, el lugar de la transmisión máxima indicará la región en la cual la onda primaria tenía la misma fase que la onda modificada, y las variaciones de la transmisión en ese lugar serán aproximadamente proporcionales a la intensidad de la onda modificada. Por consiguiente, si iluminamos la placa detectora con una imitación

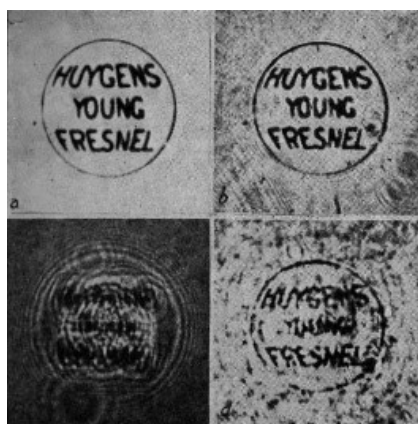


Figura B.2: (a) Micrografía original. (b) Micrografía directamente fotografiada a través del mismo sistema óptico usado para la reconstrucción. (c) Diagrama de interferencia. (d) Reconstrucción del objeto original usando el diagrama.

óptica de la onda eléctrica, solo aquella parte de la onda primaria será fuertemente transmitida la cual imita amplitud. Se puede mostrar que el “ocultamiento” de las regiones externas al lugar de transmisión máxima tiene solamente un pequeño efecto de distorsión. Uno debe esperar que mediante este arreglo se va detrás el objeto original como si estuviera en dicho lugar.

El principio fue probado en un modelo óptico, en éste, el diagrama de interferencia se produjo con una luz monocromática en lugar de electrones. La impresión se reemplazó en el aparato, apoyada por una lente de visión la cual admitía alrededor de  $\sin \alpha = 0.04$ , y la imagen formada fue observada y finalmente fotografiada a través de un microscopio. Se puede ver en la figura [B.2](#) que la reconstrucción, imperfecta, logra la separación de algunas letras que sólo podía ser separadas por observación directa del objeto a través del mismo sistema óptico.

La resolución es notablemente imperfecta sólo en el centro donde el marco circular crea una perturbación. Otras imperfecciones de la reconstrucción son esencialmente debidas a defectos en los objetivos del microscopio que se usaron para generar los puntos

focales y para la observación. Es una propiedad interesante de estos diagramas que constituyen detecciones tridimensionales de objetos planos, un plano después de otro plano de objetos extendidos se puede observar en el microscopio, justo como si el objeto estuviera realmente en esa posición. En el microscopio a través del punto foco y más allá de este, encontramos una segunda imagen del objeto original, en posición simétrica al centro respecto al punto foco. La explicación es, brevemente, el diagrama fotográfico no puede distinguir cambios de fase positivos o negativos respecto a la onda primaria, y esta imagen corresponde al mismo cambio de fase como la original, pero con signo invertido. Si el principio es aplicado al microscopio electrónico, las dimensiones en el sintetizador óptico deben ampliarse, en el radio de las ondas de luz a ondas eléctricas, esto es, unas diez mil veces. Uno puede proveer un sistema de iluminación que es una réplica óptica exacta del condensador eléctrico de lentes, incluyendo su aberración esférica. Para evitar la ampliación del diagrama se tiene que introducir una lente más, con una longitud focal igual a la distancia del objeto desde la placa detectora en los dispositivos electrónicos, en tal posición que la placa aparezca en el infinito cuando se mira desde el espacio óptico del punto foco.



## Apéndice C

### Holografía Contemporánea

El problema fundamental al que se enfrenta la holografía es la detección y la reconstrucción de la amplitud y fase de una onda que proviene de un objeto iluminado coherentemente. Todos los medios de detección responden solamente a la intensidad de la luz, es por esta razón que la información de la fase, antes de ser detectada, debe convertirse en variaciones de intensidad. Una técnica para lograr esto es el uso de la interferometría, esto quiere decir que se utilizará un segundo frente de onda que sea mutuamente coherente con el frente de onda que se desea detectar y cuyas fase y amplitud sean conocidas.

Sea  $a(x, y) = |a(x, y)|e^{i\phi(x, y)}$  el frente de onda que se quiere

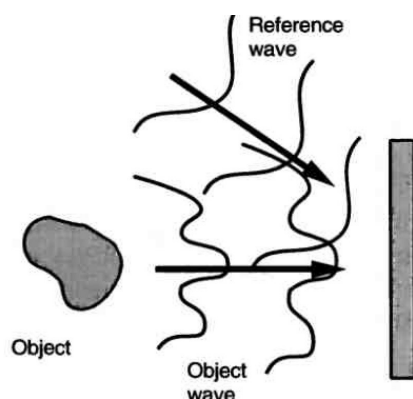


Figura C.1: Detección Interferométrica.

detectar y reconstruir.

Sea  $A(x, y) = |A(x, y)|e^{i\psi(x, y)}$  la onda de referencia con la cual  $a(x, y)$  interfiera; y la intensidad de la suma estará dada por:

$$I(x, y) = |A(x, y)|^2 + |a(x, y)|^2 + 2|A(x, y)||a(x, y)| \cos[\psi(x, y) - \phi(x, y)] + cte. \quad (C.1)$$

Donde los primeros dos términos de la expresión dependen sólo de las intensidades de la onda individual, el tercer término depende de las fases relativas. Por tanto, la información sobre la amplitud y fase de un objeto determinado ha sido grabada o detectada. El problema en general es la recuperación tanto de la amplitud como de la fase del objeto, y la dificultad radica en que la fase aparece en la irradiancia y no está de manera explícita. El material o el medio que se utiliza para detectar el patrón de interferencia descrito arriba debe ser tal que reproduzca un mapeo lineal entre la intensidad obtenida en el proceso de detección y la amplitud transmitida por o reflejada por el objeto en cuestión durante el proceso de reconstrucción. Existen varios materiales adecuados para el proceso de detección de la holografía, anteriormente solían usarse películas fotográficas las cuales cumplían con la relación lineal en la curva de emulsión entre  $t_A$  vs  $E$ . Sin embargo, gracias al rápido desarrollo de la tecnología y a la teoría de los semiconductores hoy podemos usar otro tipo de objetos que sirven de igual manera para la detección de la holografía.

Una vez que la información de la amplitud y fase de la onda objeto  $a(x, y)$  ha sido detectada, debemos pasar a la reconstrucción de la onda. Supongamos que la transparencia desarrollada es iluminada por una onda de reconstrucción coherente  $B(x, y)$ . La luz transmitida por la transparencia es:

$$\begin{aligned} B(x, y)t_A(x, y) &= t_b B + \beta' a a^* B + \beta' A^* B a + \beta' A B a^* \\ &= U_1 + U_2 + U_3 + U_4 \end{aligned} \quad (C.2)$$

en donde  $t_a$  es la amplitud de la transmitancia de la película desarrollada,  $t_b$  es un "sesgo" de transmitancia uniforme establecido por la exposición de referencia constante, y  $\beta'$  es el producto de la pendiente  $\beta$  de la curva  $t_a$  vs  $E$  en el punto sesgo y el tiempo de exposición. Note que si  $B$  es simplemente una réplica exacta de frente de onda de referencia  $A$  el tercer término de la ecuación (C.2) será:

$$U_3(x, y) = \beta' |A|^2 a(x, y) \quad (C.3)$$

Ya que la intensidad de la onda de referencia es uniforme, es claro que la componente  $U_3$  de la onda reconstruida es una constante multiplicativa, esto es una réplica exacta de la onda original  $a(x, y)$  como podemos apreciar en la figura C.2.

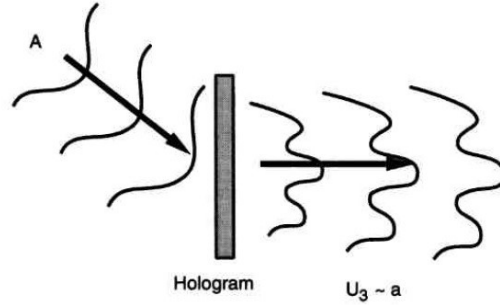


Figura C.2: Frente de onda reconstruido con la onda de referencia original A como iluminación.

De manera similar, si  $B(x, y)$  se escoge como el conjugado de la onda de referencia original, esto es,  $B(x, y) = A^*(x, y)$ , el cuarto término de la ecuación (C.2) será:

$$U_4(x, y) = \beta' |A|^2 a^*(x, y) \quad (C.4)$$

el cual es proporcional al conjugado del frente de onda original. Este caso se ilustra en la figura C.3

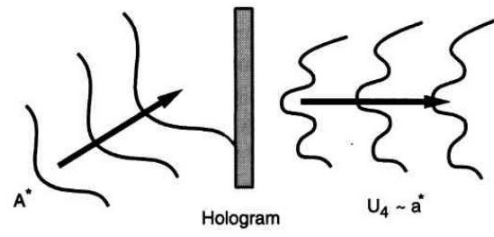


Figura C.3: Frente de onda reconstruido con la onda de referencia conjugada  $A^*$  como iluminación.

# Apéndice D

## Códigos de Programación

### D.1. Programa par Generar Patrones de Difracción

```
real*8 nex,pi,dibx,diby,rabx,raby,zccd,tpixx,tpixy,n
real*8 lamda0,lamda,kon,aa,xccd,yccd,xb,yb
real*8 ra,xc,yc,zc,yaa,tra,race
real*8 r,cor,ser,er2,ei2,irra,imax,rama
real*8 er(0:2000,0:2000),ei(0:2000,0:2000)
real*8 irr(0:2000,0:2000)
real*8 corx(200000),cory(200000),corz(200000),ban
integer npixx,npixy,dn,iccd,jccd,i,j,io,jo
pi=3.14159d0
nex=2.0d0
c nex=exponente para definir la forma elíptica (nex=2)
c o rectangular (nex=200) de la obstrucción
c unidades en milímetros
c rab=diámetro del bicho en micras
do iii=1,1,1
dibx=0.007620d0*dfloat(iii)
write(*,*)"diámetro de la celula",1000.0*dibx,"micras"
diby=dibx
rabx=dibx/2.0d0
```

[illegible]

```

C tamaño cuadro
do jo=-npixy,npixy,dn
c (xb,yb)=coordenas sobre el plano del objeto
xb=dfloat(io)*rabx/dfloat(npixx)
yb=dfloat(jo)*raby/dfloat(npixy)
c se impone restricción de forma del objeto
ra=dsqrt((xb/rabx)**nex+(yb/raby)**nex)
if(ra.le.1.0d0)then
tra=0.5d0
else
tra=1.0d0
endif
xc=(xccd-xb)**2.0d0
yc=(yccd-yb)**2.0d0
zc=zccd*zccd
c write(1,*)xb,yb
r=dsqrt(xc+yc+zc) c (cor,ser)=partes real e imaginaria de la on-
da esférica
cor=dcos(kon*r)/(r*r)
ser=dsin(kon*r)/(r*r)
c cálculo de la integral de Fresnel
er(iccd,jccd)=er(iccd,jccd)+aa*tra*cor
ei(iccd,jccd)=ei(iccd,jccd)+aa*tra*ser
enddo
enddo
enddo
enddo
imax=0.0d0
c cálculo de la irradiancia
do iccd=0,npixx,dn
do jccd=0,0,dn
er2=er(iccd,jccd)*er(iccd,jccd)
ei2=ei(iccd,jccd)*ei(iccd,jccd)

```

```

irra=er2+ei2
Irr(iccd,jccd)=irra
if (irra.gt.imax)then
imax=irra
else
endif
enddo
enddo
write(*,*)imax",imax
do iccd=0,npixx,dn
do jccd=0,0,dn Irr(iccd,jccd)=Irr(iccd,jccd)/imax
enddo
enddo
c goto 111
i=0
do iccd=-npixx,npixx,dn
do jccd=-npixy,npixy,dn
i=i+1
corx(i)=dfloat(iccd)*tpixx
cory(i)=dfloat(jccd)*tpixy
corz(i)=Irr(iccd,jccd)
enddo
enddo
goto 111
np=i

```

## D.2. Programa para determinar el tamaño de la célula

```

integer i,ntp,ie
real*8 xos(35),yss(35),a,b,ysex,Deltay(35),AA,m,xinter

```



## *D.2. PROGRAMA PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE LA CÉLULA*107

```
ntp=35
write(*,*) 'De Tamaño de la Sombra Experimental'
read(*,*)ysex
open(1,file='475.dat')
do i=1,ntp
read(1,*) a,b
xos(i)=a
yss(i)=b
enddo
close(1)
do i=1,ntp
write(*,*)xos(i),yss(i)
enddo
do i=1,ntp-1
Deltay(i)=yss(i)-ysex
C write(*,*)Deltay(i)
Deltay(i+1)=yss(i+1)-ysex
AA=Deltay(i)*Deltay(i+1)
if(AA.lt.0)then
ie=i
else
endif
write(*,*)ie
enddo
write(*,*)xos(ie),yss(ie)
write(*,*)xos(ie+1),yss(ie+1)
m=(yss(ie+1)-yss(ie))/(xos(ie+1)-xos(ie))
write(*,*)'La pendiente de la recta es',m
xinter=((ysex-yss(ie))/m)+xos(ie)
write(*,*)xinter
pause
end
```



# Bibliografía

- [1] DENNIS GABOR, «Microscopy by Reconstructed Wave-Fronts», *Proceedings of the Royal Society*, **Vol. 197**, págs. 454–487, 1949.
- [2] GARCIA-SUCERQUIA J., «Microscopía holográfica digital sin lentes con resolución micrométrica y fuentes multispectrales» *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, **Vol. 39**, págs. 20-28, 2015.
- [3] AYDOGAN OZCAN y EUAN MCLEOD, «Lensless Imaging and Sensing», *Annual Reviews*, **Vol. 1**, págs. 77–102, 2016.
- [4] AYDOGAN OZCAN, ONUR MUDANYALI, DEREK TSENG, CHULWOO OH, SERHAN O. ISIKMAN, IKBAL SENCAN, WAHEB BISHARA, CETIN OZTOPRAK, SUNGKYU SEO y BAHAR KHADEMHOSEINI, «Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications» *Lab on a Chip*, **Vol. 10**, págs. 1417-1428, 2010.
- [5] EUGENE HECHT, «Óptica», *5ta Edición*, ED. PEARSON EDUCACIÓN , 2017.
- [6] «“El M.C. José Manuel Rodríguez Luna declaró y describió la forma en la que se prepara la muestra de eritrocitos". (J. Manuel Rodríguez Luna, comunicación personal, 20 de septiembre de 2017)»

- [7] «“El M.C. José Manuel Rodríguez Luna declaró que en los bordes del cubreobjetos se encuentra una menor densidad de población de células". (J. Manuel Rodríguez Luna, comunicación personal, 25 de septiembre de 2017)»
- [8] ONUR MUDANYALI, CETIN OZTOPRAK, DEREK TSENG, ANTHONY ERLINGER y AYDOGAN OZCAN «Detection of waterborne parasites using field-portable and cost-effective lens-free microscopy», *Lab on a Chip*, **Vol. 1**, págs. 2419–2423, 2010.
- [9] «“El M.C. José Manuel Rodríguez Luna declaró que una forma fácil y rápida de encontrar parásitos en el cultivos de agua contaminada como floreros de agua sucia". (J. Manuel Rodríguez Luna, comunicación personal, 25 de septiembre de 2017)»
- [10] AYDOGAN OZCAN y UTKAN DEMIRCI «Ultra wide-field lens-free monitoiring of cells on-chip», *Lab on a Chip*, **Vol. 1**, págs. 98–106, 2007.
- [11] «“El M.C. José Manuel Rodríguez Luna declaró que en todo microscopio óptico convencional que el había utilizado no se pueden apreciar los canales que surgen debido a la aplicación de colorante". (J. Manuel Rodríguez Luna, comunicación personal, 25 de septiembre de 2017)»
- [12] LODISH, BERK, MATSUDAIRA, ET AL «Biología Celular y Molecular», *5ta Edición*, ED. MÉDICA PANAMERICANA, 2005. P. 19
- [13] COOPER y HAUSMAN, «La Célula», *4ta Edición*, ED. MARBÁN, 2008. P. 482