



INAOE

Recuperación de fase mediante microscopía DIC

por el

Lic. Rafael Páez López

Tesis sometida como requisito parcial para
obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE ÓPTICA**

en el

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y
Electrónica**

Supervisada por:

Dr. Julio César Ramírez San Juan

INAOE

Dr. Donald D. Duncan

Portland State University

AGOSTO 2012

Tonantzintla, Puebla

©INAOE 2012

El autor otorga al INAOE el permiso de
reproducir y distribuir copias en su totalidad, o
en partes, de esta tesis



Dedicatoria

A mi familia, especialmente a mi **madre**.

Por su amor, confianza y comprensión en cada día, por enseñarme lo que no se aprende en los libros; y que gracias a sus palabras de aliento he crecido como persona; quién me ha enseñado que en el sinuoso camino de la vida sólo se trasciende con coraje, pasión y sacrificio. Por su apoyo incondicional, les doy gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y como estudiante.

A mis **profesores**.

Que han compartido generosamente sus conocimientos.

A mis **amigos y compañeros de estudio**.

Por brindarme su amistad y apoyo moral.

Agradecimientos

A los **Dres. Julio César Ramírez San Juan y Donald Duncan.**

Por la confianza que han puesto en mi, por sus enseñanzas, y su apoyo en el ámbito académico.

Al **INAOE** y a **CONACYT.**

Por la oportunidad que me ha dado de crecer profesionalmente, por abrirme los ojos a un mundo de preparación para el futuro.

Al **Dr. Scott Prah.** y al **Oregon Medical Laser Center**

Por haberme permitido colaborar en uno de sus proyectos y facilitarme el acceso a sus laboratorios.

A mis sinodales los **Dres. J. Félix Aguilar Váldez, Victor Manuel Arrizón Peña y José Alberto Delgado Atencio.**

Quienes con sus comentarios y observaciones han hecho de éste un mejor trabajo.

A mis **compañeros y amigos del INAOE.**

Quienes me acompañaron en esta travesía.

Índice general

1. Introducción	1
2. Interfererometría por corrimiento de fase (PSI)	5
2.1. Comparación de la técnica PSI con la interferometría convencional	8
2.2. Algoritmo de cuatro pasos	11
2.2.1. Algoritmo de Carré	15
3. Microscopía DIC	19
3.1. Interferometría por desplazamiento lateral de frente de onda . . .	19
3.2. Principios de la microscopía DIC	21
3.2.1. El interferómetro Mach-Zehnder como un interferómetro por desplazamiento lateral de un frente de onda	23
3.2.2. Microscopía DIC como método para obtener gradientes de fase	25
3.2.3. Configuración óptica del microscopio DIC	28
3.2.4. Implementación de Carré en el DIC	30
4. Recuperación de fase a partir de gradientes	35
4.1. Algoritmo de Fried	35
4.2. Proceso de puntadas	39

5. Resultados experimentales	45
5.1. Arreglo experimental	45
5.2. Muestras	47
5.3. Determinación del corrimiento de fase (β) en el microscopio DIC .	49
5.4. Determinación de los gradientes de fase	52
5.5. Implementación del algoritmo de Fried	55
5.6. Resultados para la muestra 1	56
5.7. Resultados para la muestra 2	59
6. Conclusiones	61
6.0.1. Trabajo a futuro	62
Apéndice A	65
.1. Desarrollo de algoritmo de Carré	65
.2. Prismas de Wollaston y de Nomarski	68
Apéndice B	75
.3. Códigos de programación	75
.3.1. Código de Fried	75
.3.2. Código del proceso de puntadas	77

Índice de figuras

2.1. La variación de intensidad con respecto a la fase de referencia en un punto del interferograma.	8
2.2. Cuatro interferogramas con un corrimiento de fase de 90° entre cada uno, con su respectivo corte horizontal por el centro [4]. . . .	14
3.1. Diagrama esquemático para la interferometría por desplazamiento lateral en a) un haz colimado y b) un haz esférico [13].	20
3.2. Interferómetro de Mach-Zehnder [9].	21
3.3. Interferómetro Mach-Zehnder como sistema de interferencia por desplazamiento lateral [9].	23
3.4. Ilustración de a) los frentes de ondas separados por el microscopio DIC Σ_1 y Σ_2 , b) el frente de onda saliente de la gota Σ , y c) un frente de onda atravesando una gota Σ_p [14].	25
3.5. El sistema del microscopio DIC utilizando dos prismas de Wollaston [17].	29
4.1. Arreglo de píxeles de 3×3 para trabajar con el algoritmo de Fried.	36
4.2. a) Mosaicos adyacentes de la imagen y b) representación de los valores para $M_{u,v}$	40
4.3. Representación de dos mosaicos horizontalmente adyacentes.	41
4.4. Mosaicos acoplados con el proceso de puntadas.	42

5.1. Esquema representativo del microscopio DIC.	46
5.2. Imagen AFM de una de las tres muestras que se reportan en este trabajo.	48
5.3. Imágenes tomadas para el análisis de Carré con diferentes retrasos de fase.	50
5.4. Mapa de β (grados) obtenido a partir de las imágenes en la figura 5.3.	51
5.5. a) Distribución de los valores para β y b) el mapa de ϕ utilizando un valor constante para β	51
5.6. Método para obtener los gradientes ortogonales de la imagen DIC.	52
5.7. Región de interés de las imágenes DIC para el caso a)0° y b)90° respecto del sistema de referencia del microscopio.	53
5.8. a) Mapa final para β y su b) distribución de valores	53
5.9. Mapas de ϕ para los casos a) x y b) y	54
5.10.Las derivadas de la imagen del espécimen en a) x y b) y . Los cuadrados indican la región que fue substraída.	55
5.11.Comparación entre las fases estimadas del a)DIC usando luz blanca y el b)AFM.	57
5.12.a)Correlación entre los resultados y b)corte de las imágenes en $x = 40\mu m$	58
5.13.Comparación entre las fases estimadas del a)DIC usando filtro de 405nm y el b)AFM para la segunda muestra.	59
5.14.a)Correlación entre los resultados y b)corte de las imágenes en $x = 40\mu m$	60
1. Diagrama esquemático del retraso de fase producido por un prisma de Wollaston.	69

2. Planos de interferencia en un prisma de a) Wollaston y de b) Nomarski.	73
---	----

Resumen

Aquí presentamos un método para utilizar un microscopio de interferencia diferencial de contraste (DIC, por sus siglas en inglés) para adquirir información cuantitativa de fase. Se discute la propagación de la luz a través de sus componentes y lo que ocurre cuando se propaga a través de un espécimen que presenta gradientes de fase. Se establece una caracterización basada en mediciones empleando la interferometría de corrimiento de fase para adquirir información de la fase del objeto bajo estudio.

También se presenta un algoritmo para integrar los gradientes de la fase del frente de onda para cada punto de la muestra de la información digitalizada. Se discute acerca de los principios del funcionamiento del microscopio DIC, el procedimiento de medición y la interpretación cuantitativa de los resultados obtenidos.

Abstract

Here we present a method using a differential interference contrast microscope (DIC, for its acronym in English) to acquire quantitative phase information. We discuss the propagation of light through its components and what happens when it goes through a specimen having phase gradients. Characterization is established based on measurements using the phase shift interferometry to recover the phase information of the test object.

We show an algorithm for integrating the phase gradients of the wavefront for each sample point of the scanned information. We discuss the principles of operation of the DIC microscope, the measurement procedure and quantitative interpretation of the results.

Capítulo 1

Introducción

En la práctica común, el microscopio DIC es utilizado para hacer observaciones de tipo cualitativo sobre las características de muestras ópticamente delgadas. Sin embargo, un número considerable de investigadores ha desarrollado esquemas para obtener información cuantitativa, como la fase, a partir de las imágenes obtenidas con este microscopio. Por ejemplo, Preza et al. usaron las imágenes de un DIC a diferentes orientaciones azimutales para reconstruir la fase de muestras semitransparentes[1]. Dana [2] diseñó una calibración sistemática e implementó un arreglo en el cual la relación entre la fase y la intensidad es aproximadamente lineal. En distinción a estos estudios, en este trabajo nos interesamos en la variable directamente medible utilizando el microscopio DIC, es decir, el gradiente de fase.

La condición en la microscopía DIC, para derivar información cuantitativa de la fase, es que uno debe conocer la cantidad de “corte” que se produce en los frentes de onda dentro del microscopio [3], lo cual se detallará más adelante. La meta de este trabajo es obtener mediciones cuantitativas de fase para un objeto semitransparente utilizando un microscopio DIC. Para poder hacer esto es necesario adquirir información sobre la derivada de la fase en direcciones

ortogonales utilizando el microscopio DIC. Esta aproximación puede ser de utilidad para caracterizar las propiedades de especímenes biológicos, como son su índice de refracción o su topología.

Una vez que se obtiene el gradiente de fase, se hace el uso del denominado método de Fried para producir una aproximación de la fase absoluta para la superficie de la muestra. Este reconstructor divide la imagen obtenida en varias partes, denominadas mosaicos, e las va acoplando (Veáse Capitulo 3) de manera que se extienda sobre los miles de píxeles en cada dirección. Esta tarea crece en una cuarta potencia del número total de píxeles, es por eso que se lleva a cabo la reconstrucción de la imagen por partes, en una serie de mosaicos de una dimensión que sea accesible programar en la computadora. Cada uno de estos mosaicos de la imagen tiene una constante de integración desconocida, por lo que deben ser determinadas si se quiere juntar todos los mosaicos para formar una sola imagen y obtener la imagen de la fase absoluta.

El presente trabajo esta organizado de la siguiente manera:

En el segundo capítulo se presenta la teoría básica para el entendimiento de la obtención de fase de una muestra a partir de la interferometría de corrimiento de fase (PSI, por sus siglas en inglés), se mencionan algunas comparaciones de este método con la interferometría tradicional así como algunos métodos de obtención de corrimiento de fase en un sistema óptico. Posteriormente se presenta un ejemplo de estrategia o algoritmo que se utiliza para resolver y obtener la fase de una imagen, y adicionalmente se describe el algoritmo de Carré, el cual se acopla con nuestro experimento para la obtención de fase.

En el capítulo tres se presenta una revisión de los conceptos en que se basa la microscopía de interferencia diferencial de contraste (DIC), los cuales abarcan desde la interferometría de corte de un frente de onda, el cual es el principio

fundamental con el que opera el microscopio. Se muestra el funcionamiento a grandes rasgos del microscopio y además un análisis de cómo se obtienen gradientes de fase de una muestra utilizando la microscopía DIC.

En el cuarto capítulo se presenta una descripción del método de integración utilizado para obtener la fase absoluta del espécimen, denominado método de Fried, a partir de la información digitalizada.

En el capítulo cinco se presenta la implementación del algoritmo de Carré en el experimento para determinar el valor del corrimiento y de los gradientes de fase que se obtienen con el microscopio DIC, así como también se muestra el análisis que se debe llevar a cabo para recuperar la fase absoluta del objeto bajo estudio en el microscopio.

En el último capítulo se presentan las conclusiones del trabajo desarrollado, así como algunas consideraciones que deben hacerse para obtener mejores resultados.

Capítulo 2

Interfererometría por corrimiento de fase (PSI)

En este capítulo se revisa el principio fundamental en el cual se basa el método utilizado para obtener información cuantitativa a través del microscopio DIC. Se muestran algunos de los algoritmos que han sido empleados para la recuperación de fase y se consideran algunas fuentes de error.

En los últimos años, la interferometría por corrimiento de fase (PSI por sus siglas en inglés) ha presentado un gran desarrollo, ya que a diferencia de otras técnicas, ésta no depende de la configuración del arreglo experimental [4], pero la colección de datos y el análisis de este método puede ser aplicado a una gran variedad de situaciones experimentales.

El concepto detrás de la interferometría de corrimiento de fase (PSI) es que se introduce un corrimiento de fase que varía con el tiempo entre el frente de onda de referencia y el frente de onda de la muestra bajo análisis, en el interferómetro. De esta manera se produce una señal, que cambia con el tiempo, para cada

punto de medición en el interferograma, y la fase relativa entre los dos frentes de onda se encuentra codificada entre estas señales.

Para ejemplificar ésto se realizará un análisis considerando la fase de un frente de onda que es independiente de la configuración del arreglo experimental que se esté empleando. Considerando que se trabaja con la fase de un frente de onda $\Phi(x, y)$, donde x y y son las coordenadas espaciales, producida por una longitud de onda λ . La expresión general para los campos eléctricos de los frentes de onda de referencia y de prueba en el interferómetro serían:

$$E_r(x, y) = A_r(x, y)e^{i[\Phi_r(x, y) - \delta_i]} \quad (2.1)$$

y

$$E_p(x, y) = A_p(x, y)e^{i\Phi_p(x, y)}, \quad (2.2)$$

respectivamente, donde $A_r(x, y)$ y $A_p(x, y)$ son las amplitudes del frente de onda, $\Phi_r(x, y)$ y $\Phi_p(x, y)$ son las fases de los frentes de onda, y δ_i es el corrimiento de fase que varía con el tiempo introducido al haz de referencia, es decir, δ_i es el corrimiento de fase relativo entre los dos haces.

El resultado del patrón de interferencia, salvo una constante de proporcionalidad, está dado por:

$$I(x, y) = |E_r(x, y) + E_p(x, y)|^2. \quad (2.3)$$

Sustituyendo la expresión de los frentes de onda en la función anterior se tiene que:

$$I(x, y) = |A_r(x, y)e^{i[\Phi_r(x, y) - \delta_i]} + A_p(x, y)e^{i\Phi_p(x, y)}|^2, \quad (2.4)$$

$$I(x, y) = A_r^2(x, y) + A_p^2(x, y) + A_r(x, y)A_p(x, y) [e^{i[\Phi_r - \delta_i - \Phi_p]} + e^{-i[\Phi_r - \delta_i - \Phi_p]}], \quad (2.5)$$

$$I(x, y) = I'(x, y) + I''(x, y)\cos [\Phi_p - \Phi_r + \delta_i], \quad (2.6)$$

donde $I'(x, y) = A_r^2(x, y) + A_p^2(x, y)$ es la intensidad promedio, $I''(x, y) = 2A_r(x, y)A_p(x, y)$ es la modulación de franjas o de intensidad. Si ahora se renombra la diferencia de los frentes de ondas $\Phi(x, y) = \Phi_p(x, y) - \Phi_r(x, y)$, se obtiene:

$$I(x, y) = I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) + \delta_i]. \quad (2.7)$$

A esta última ecuación se le conoce como la ecuación fundamental de la interferometría por corrimiento de fase [4]. La intensidad en cada punto varía como una función sinusoidal al introducir el corrimiento de fase $\delta(t)$. Este resultado puede ser visto como si la intensidad estuviera en función de $\delta(t)$; para un corrimiento de fase lineal, esto es equivalente a la variación de la intensidad con el tiempo, como se muestra en la figura 2.1.

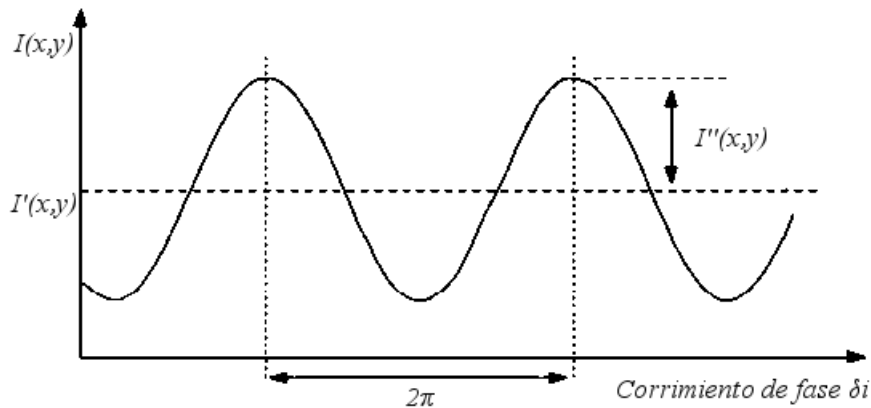


Figura 2.1: La variación de intensidad con respecto a la fase de referencia en un punto del interferograma.

Las tres variables desconocidas en la ecuación 2.7 pueden identificarse en la señal de la figura 2.1. El término constante $I'(x, y)$ es la intensidad sistemática (también llamada offset), $I''(x, y)$ corresponde a la amplitud de modulación, y $\Phi(x, y)$ es la fase desconocida. El mapa entero de la fase desconocida del frente de onda $\Phi(x, y)$ puede ser medido monitorizando y comparando el retraso temporal en todos los puntos medidos en el interferograma. De esta manera, la intensidad de modulación y los términos sistemáticos son comparados a partir de este retraso, y por tanto, la fase del frente de onda medida está desacoplada en estos términos [5].

2.1. Comparación de la técnica PSI con la interferometría convencional

Típicamente, los interferogramas se analizan a partir del tipo de franjas que presenten y por lo general se pretende encontrar el centro de las franjas, es decir,

ubicar con precisión el máximo o mínimo de cada franja. Se puede asumir que se facilitaría el trabajo si se utilizaran las mediciones de un número reducido de franjas, pero la información sólo provendría de las franjas centrales y limitaría los datos que se pueden obtener. Este intercambio entre precisión y cantidad de información se llega a complicar más por el hecho de que la mayoría de los programas utilizados para el análisis de este tipo de datos requiere de un espaciamiento regular entre las franjas [6].

En la PSI, el análisis del interferograma es independiente de estar encontrando el centro de las franjas o de hacer un seguimiento del movimiento de las franjas, uno puede ocupar cualquier tipo de patrón de franjas, lo cual se convierte en una situación mucho más práctica. Aún cuando sea un patrón sin franjas (en el caso que una sola franja cubra todo el campo de vista) o para el caso de una complicada serie de franjas muy pegadas también puede ser analizado correctamente.

Otra ventaja de la PSI es que no es sensible a las variaciones espaciales de intensidad, a la sensibilidad del detector o a algún patrón de ruido [7]. Se puede modificar la ecuación 2.7 para incluir estos efectos, sea la sensibilidad del detector y el patrón de ruido denotado por $s(x, y)$ y $r(x, y)$, respectivamente. Como se ve, las variaciones espaciales de intensidad ya están incluidas en la dependencia (x, y) de los términos $I'(x, y)$ y $I''(x, y)$. El resultado que obtenemos con nuestro detector $d(x, y)$ sería:

$$d(x, y) = s(x, y)\{I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) + \delta_i]\} + r(x, y), \quad (2.8)$$

la cual puede ser reescrita fácilmente como:

$$d(x, y) = [s(x, y)I'(x, y) + r(x, y)] + [s(x, y)I''(x, y)] \cos[\Phi(x, y) + \delta_i]. \quad (2.9)$$

Estos cambios adicionales modifican sólo las intensidades grabadas para cada punto en la medición, pero no tiene ningún efecto sobre el retraso temporal. Y como la fase del frente de onda está encriptada dentro de este retraso, la precisión para ésta cantidad no es degradada con este tipo de variaciones espaciales. En otras palabras, esto puede entenderse de manera que no se puede omitir esta consideración para alguna señal de ruido que pueda alterar la repetibilidad de las mediciones.

En las ecuaciones 2.7 y 2.9 se ha asumido que el único término dependiente del tiempo es δ_i , así que cualquier variación a esta suposición podría introducir errores al análisis de la PSI. La fase del frente de onda $\Phi(x, y)$ está codificada en la medición del retraso temporal para cada punto, y cualquier variación temporal que ocurra durante el intervalo de medición podría degradar el funcionamiento del sistema que trabaje con la PSI.

También se debe considerar que, en caso de trabajar con una fuente láser, otra posible fuente de error es la variación temporal de la intensidad del láser, pero usualmente este problema se resuelve estabilizándolo, al dejar que se caliente por un tiempo prudente. Otra posible fuente de error, única para la PSI, es la incertidumbre que puede presentarse en el método para introducir el corrimiento de la fase δ_i [4]. Ésto debe ser corregido para que el cambio de fase sea uniforme sobre todo el mapa de nuestro interferograma.

Dependiendo de las posibles variaciones que se pueden dar debido al método que se esté empleando para obtener un corrimiento de fase, se busca la “mejor” manera de recolectar y analizar los datos de los interferogramas para resolver la ecuación 2.7 y encontrar la fase desconocida del frente de onda. Para tener una idea general del proceso de análisis que se emplea para este tipo de mediciones, se comenzará por hablar de un algoritmo conceptualmente simple

llamado algoritmo de cuatro pasos.

2.2. Algoritmo de cuatro pasos

Al utilizar la PSI siempre surgen diferencias entre las diversas formas de medición, dependiendo de cómo se esté trabajando para variar la fase y del número de veces que se esté midiendo el patrón de interferencia obtenido. Todas esas variaciones dan como resultado la necesidad de emplear diferentes métodos de análisis según le convenga al usuario, a continuación se presenta una discusión sobre algunas de las diferentes maneras que se emplean para recuperar la fase del frente de onda [8].

El *algoritmo de cuatro pasos* requiere cuatro interferogramas donde se introduce una diferencia de fase entre cada uno, de la muestra a analizar, que han sido grabados y digitalizados. En este caso se trabaja con un corrimiento de fase específicamente de 90° , el cual se introduce entre la señal de referencia y la de prueba para cada interferograma guardado en secuencia. En este caso se introdujo un corrimiento discreto entre cada medición, es decir, la dependencia temporal ha sido cambiada en cada interferograma, que denotamos con el índice i . La función $\delta(t)$ ahora toma cuatro valores discretos:

$$\delta_i = 0, \pi/2, \pi, 3\pi/2; \quad i = 1, 2, 3, 4. \quad (2.10)$$

Sustituyendo cada uno de estos cuatro valores en la ecuación 2.7 se tiene como resultado cuatro ecuaciones que describen los cuatro patrones de intensidad en los interferogramas medidos:

$$\begin{aligned}
 I_1(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y)], \\
 I_2(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) + \pi/2], \\
 I_3(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) + \pi], \\
 I_4(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) + 3\pi/2].
 \end{aligned}
 \tag{2.11}$$

Aplicando una simple identidad trigonométrica para cada una de estas ecuaciones las podemos expresar de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 I_1(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y)], \\
 I_2(x, y) &= I'(x, y) - I''(x, y)\sin[\Phi(x, y)], \\
 I_3(x, y) &= I'(x, y) - I''(x, y)\cos[\Phi(x, y)], \\
 I_4(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\sin[\Phi(x, y)].
 \end{aligned}
 \tag{2.12}$$

Como puede notarse, estas cuatro ecuaciones contienen tres variables desconocidas ($I'(x, y)$, $I''(x, y)$ y $\Phi(x, y)$) que pueden ser resueltas para obtener el valor de $\Phi(x, y)$ para cada punto del interferograma, cabe señalar que en este caso una cuarta ecuación sólo se incluye por su simplicidad. Como se muestra a continuación, para este caso se comienza por eliminar el término $I''(x, y)$ al hacer una substracción para las ecuaciones pares:

$$I_4 - I_2 = 2I''(x, y)\sin[\Phi(x, y)] \tag{2.13}$$

y

$$I_1 - I_3 = 2I''(x, y)\cos[\Phi(x, y)]. \tag{2.14}$$

Ahora se puede tomar la razón entre estas dos ecuaciones y de este modo eliminar el término de la intensidad de modulación $I''(x, y)$ para llegar a un resultado que sólo contenga la fase desconocida $\Phi(x, y)$ y las cuatro intensidades medidas:

$$\frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3} = \frac{\sin[\Phi(x, y)]}{\cos[\Phi(x, y)]} = \tan[\Phi(x, y)]. \quad (2.15)$$

Esta ecuación puede ser reescrita para obtener el resultado final para el algoritmo de cuatro pasos para la PSI como:

$$\Phi(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3} \right]. \quad (2.16)$$

Esta ecuación puede ser evaluada para cada punto medido en el mapa de los interferogramas. Se puede ver la simplicidad de análisis para este algoritmo, además de que la dependencia (x, y) se encuentra implícita en la solución. Con esto el frente de onda puede ser fácilmente evaluado y uno podría calcular la altura de la superficie utilizando la siguiente relación para la fase y la diferencia de camino óptico (DCO):

$$OPD(x, y) = \lambda\Phi(x, y)/2\pi. \quad (2.17)$$

Por lo regular, en las mediciones que se hacen utilizando la técnica PSI se utiliza un arreglo rectangular de píxeles que obtenemos a partir de nuestro detector [6]. La figura 2.2 muestra un ejemplo de cuatro interferogramas adquiridos con un corrimiento de fase de 90° entre cada uno. Entre cada imagen, pareciera que las franjas se desplazaran, pero aún más importante, la intensidad en cada punto está cambiando. Uno puede suponer que si hubiera una quinta imagen, el corrimiento de fase entre esa y la primera imagen sería de 360° , por lo que en teoría serían idénticas, por lo que ya no se incluye.

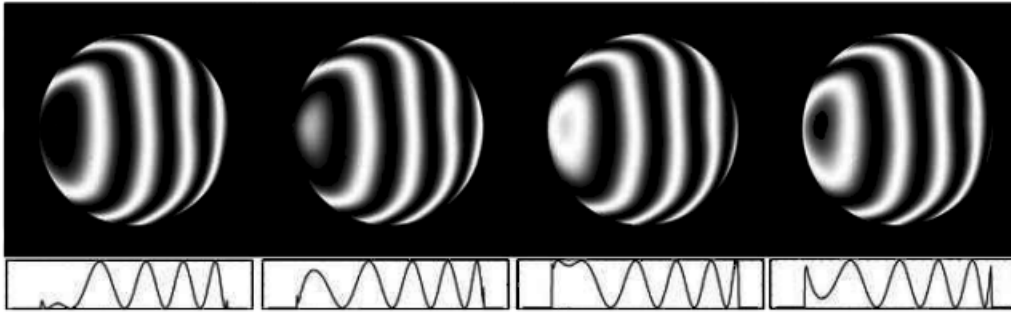


Figura 2.2: Cuatro interferogramas con un corrimiento de fase de 90° entre cada uno, con su respectivo corte horizontal por el centro [4].

A estas alturas, las diferencias entre el análisis para la PSI y la interferometría convencional debería ser más visual. La PSI calcula la fase del frente de onda cuando la intensidad varía con el tiempo para todos los puntos medidos. El resultado se interpreta como una arcotangente de la razón entre las intensidades medidas para cada punto, y no hay necesidad de encontrar el centro de las franjas ni de ordenarlas. El hecho es que el patrón en si no es relevante para la PSI, ya que no es requisito tener un número mínimo de franjas ni tomar en cuenta la forma que éstas tengan.

Si se desea, también es posible utilizar la siguiente razón entre intensidades para determinar la modulación $\gamma(x, y)$ en el interferograma:

$$\gamma(x, y) = \frac{I''(x, y)}{I'(x, y)}. \quad (2.18)$$

Utilizando las ecuaciones 2.13 y 2.14 junto con las ecuaciones 2.12, se puede obtener:

$$\gamma(x, y) = \frac{2 [(I_4 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2]^{1/2}}{I_1 + I_2 + I_3 + I_4}, \quad (2.19)$$

donde la dependencia (x, y) de la medición ya está implícita. La información que nos arroja esta nueva variable, $\gamma(x, y)$, se utiliza para evaluar la calidad de los datos que han sido recolectados [4]. Si ésta tiene un valor cercano a uno es considerado bueno ya que las imágenes presentarán un buen contraste, este valor muchas veces se ocupa como un umbral para decir si la información puede verse afectada por ruido.

2.2.1. Algoritmo de Carré

Como en el algoritmo descrito anteriormente, todos los posibles algoritmos que se pueden emplear para analizar los datos obtenidos con la PSI tienen un aspecto en común, y éste es que requieren una serie de interferogramas que han sido grabados mientras se ha variado la fase, por lo que cada uno dependerá del número de interferogramas con los que se desee trabajar [9]. Ésto podría pensarse como si siempre se debería conocer *a priori* el cambio de fase que se introduce entre cada interferograma, sin embargo, esto no siempre es posible.

Si se considera la situación en que el desplazamiento de un piezoeléctrico se pueda ver alterado o que presente un cambio en la cantidad de voltaje aplicado, donde no todos los espaciamentos son iguales o de un tamaño incorrecto (es decir, 88° en lugar de 90°). Esta situación puede ser otra fuente de error en las mediciones si no se trata adecuadamente. Con el tiempo se han desarrollado diversos algoritmos en los cuáles se minimiza el efecto de este tipo de error en las variaciones del corrimiento de fase.

Aquí se presenta uno de estos algoritmos, que es con el que se trabajará en este proyecto más adelante, llamado *algoritmo de Carré*. Este algoritmo es una variación del algoritmo de cuatro pasos, pero en lugar de que la información sea recolectada con un incremento de 90° entre cada interferograma, el corrimiento

de fase en este caso es tratado como desconocido, pero puede ser resuelto dentro del análisis. Aquí sólo se asume que el corrimiento de fase es de 2β entre cada interferograma o paso, es decir, la restricción para este algoritmo es que se debe emplear el doble de un valor desconocido para el corrimiento [3], así que los valores para la fase vendrían siendo:

$$\delta_i = -3\beta, -\beta, \beta, 3\beta; \quad i = 1, 2, 3, 4. \quad (2.20)$$

Y sustituyendo estos valores de la misma forma en la ecuación 2.7, las cuatro intensidades medidas quedan representadas como:

$$\begin{aligned} I_1(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) - 3\beta] \\ I_2(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) - \beta] \\ I_3(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) + \beta] \\ I_4(x, y) &= I'(x, y) + I''(x, y)\cos[\Phi(x, y) + 3\beta]. \end{aligned} \quad (2.21)$$

Estas cuatro ecuaciones contienen a cuatro variables desconocidas, las tres que ya habíamos considerado con el algoritmo anterior y ahora la fase de referencia. La solución para el corrimiento de fase puede encontrarse al expandir estas cuatro ecuaciones y aplicando identidades trigonométricas para el seno y coseno de 3β (Véase Apéndice .1):

$$\beta(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{3(I_2 - I_3) - (I_1 - I_4)}{(I_1 - I_4) + (I_2 - I_3)} \right]^{1/2}. \quad (2.22)$$

Esta ecuación es válida para cada punto en la medición (x, y) , y así, el corrimiento de fase $2\beta(x, y)$ también puede ser determinado para cada punto. Ésto permite que las variaciones espaciales en la fase puedan ser determinadas. La solución para la fase del frente de onda en cada punto medido es:

$$\Phi(x, y) = \tan^{-1} \left\{ \tan[\beta(x, y)] \frac{(I_1 - I_4) + (I_2 - I_3)}{(I_2 + I_3) - (I_1 + I_4)} \right\}, \quad (2.23)$$

o combinando estos resultados tenemos:

$$\Phi(x, y) = \tan^{-1} \left\{ \frac{\{[3(I_2 - I_3) - (I_1 - I_4)][(I_1 - I_4) + (I_2 - I_3)]\}^2}{(I_2 + I_3) - (I_1 + I_4)} \right\}, \quad (2.24)$$

donde la dependencia (x, y) de las intensidades medidas se encuentra implícita. En el algoritmo de Carré (ecuación 2.24), el cociente puede tomar valores tanto positivos como negativos, por lo que el signo producido para la ecuación puede ser el equivocado. Suele ser común utilizar como referencia un corrimiento de fase de 90° entre cada medición ($\beta = 45^\circ$) [4], y así se puede calcular una estimación utilizando el algoritmo de cuatro pasos descrito anteriormente, y conocer si nuestro grado de error es aceptable.

Capítulo 3

Microscopía DIC

En este capítulo se presentan los conceptos básicos de la interferometría por desplazamiento lateral de frente de onda, la cual es uno de los principios que comprende la microscopía DIC, así como algunos ejemplos de este tipo de interferómetros y su relación con el funcionamiento del microscopio.

3.1. Interferometría por desplazamiento lateral de frente de onda

La interferometría por desplazamiento lateral es un campo de la interferometría que ha encontrado diversas aplicaciones, por ejemplo, en pruebas ópticas y en el estudio del flujo de gases y líquidos [13]. Básicamente, el método consiste en duplicar el frente de onda bajo estudio, desplazándolo lateralmente en una pequeña cantidad, y así, obtener un patrón de interferencia entre el frente de onda original y el desplazado.

CAPÍTULO 3. 3.1 Interferometría por desplazamiento lateral de frente de onda

La figura 3.1 ilustra la idea básica sobre la interferometría por desplazamiento lateral para a) un frente de onda plano y b) un frente de onda esférico. Cuando el frente de onda se considera plano, el desplazamiento se obtiene al mover lateralmente el frente de onda dentro de su propio plano, mientras que en el caso esférico, el desplazamiento se obtiene al recorrer el frente de onda con una rotación sobre el eje que pasa por el centro de curvatura del frente de onda.

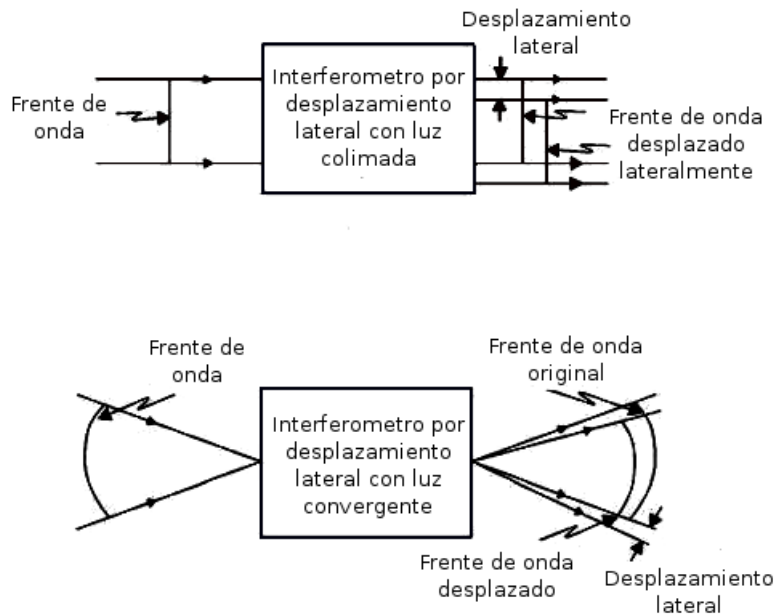


Figura 3.1: Diagrama esquemático para la interferometría por desplazamiento lateral en a) un haz colimado y b) un haz esférico [13].

Existen muchos arreglos físicos para la interferometría por desplazamiento lateral, como los que pueden ser obtenidos utilizando divisores de haz, el cual divide la amplitud del frente de onda incidente pero sin cambiar su forma. En si, se trata de superficies planas cubiertas con un material semirreflejante que son utilizados para dividir los rayos.

3.2. Principios de la microscopía DIC

El método de contraste por interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés) fue introducido por Nomarski a la microscopía, y se clasifica dentro de las técnicas básicas de la microscopía avanzada. Una característica importante de las imágenes que se obtienen con este tipo de microscopio es que tienen una apariencia de relieve o un efecto de sombreado. Ésto surge tanto por el gradiente de fase que proviene del objeto como de las irregularidades en su superficie [11].

Para poder entender el método de DIC es necesario recordar algunos conceptos básicos de la interferometría, y hablar sobre la interferometría por desplazamiento lateral de frente de onda, lo cual es el principio en el cual se basa el microscopio. La interferometría por desplazamiento lateral puede ser implementada con diferentes interferómetros clásicos, como el Mach-Zehnder (figura 3.2). Éste consiste en dos espejos semiplateados (S_1 , S_2) y de dos espejos (M_1 , M_2), en un arreglo simétrico a 45° en cada esquina de un rectángulo.

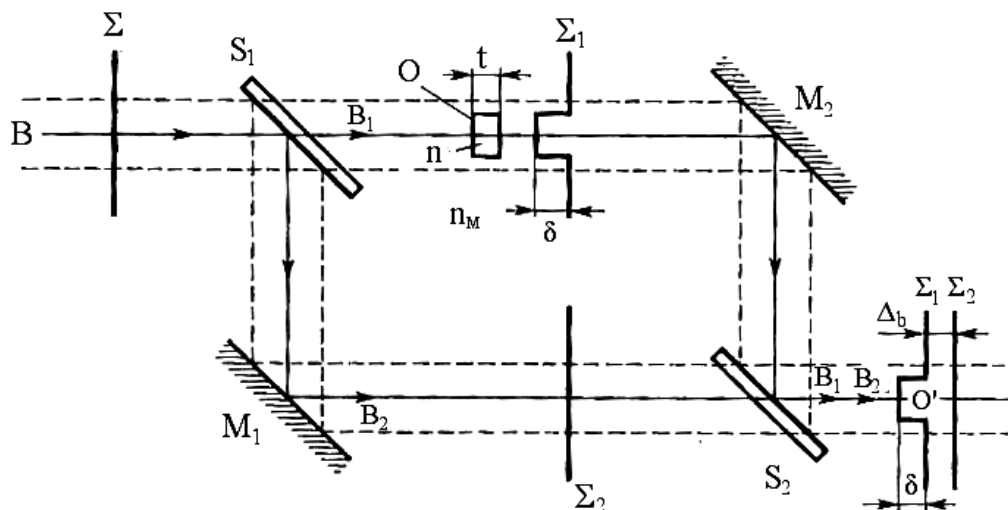


Figura 3.2: Interferómetro de Mach-Zehnder [9].

En la figura 3.2, la placa S_1 actúa como un divisor de haz y S_2 como un recombinador de haces. Suponiendo que un haz de luz colimado (B) con un frente de onda Σ incide sobre S_1 y es dividido en dos partes: una componente transmitida (B_1) y la componente reflejada (B_2). La primera es totalmente reflejada por el espejo M_2 y recombinada con la segunda, la cual es reflejada por el espejo M_1 y pasa a través de S_2 . En ausencia del objeto "O", los caminos ópticos $S_1M_2S_2$ y $S_1M_1S_2$ son iguales.

El haz objeto, B_1 , pasa a través del objeto de fase, O , bajo estudio, en general, el objeto deforma el frente de onda Σ_1 cuando pasa a través de él, introduce una diferencia de camino óptico δ entre Σ_1 y Σ_2 , dada por:

$$\delta = (n - n_M)t, \quad (3.1)$$

en la cual n denota el índice de refracción del objeto, t es el espesor del objeto, y n_M es el índice de refracción del medio que lo rodea.

A la salida del interferómetro, los haces B_1 y B_2 interfieren y generan una distribución de intensidad I dada por [9]:

$$I = a_1^2 + a_2^2 + 2a_1a_2\cos\Psi_b, \quad (3.2)$$

donde a_1 y a_2 son las amplitudes de las ondas de luz que están interfiriendo, y Ψ_b es su diferencia de fase dada por:

$$\Psi_b = \frac{2\pi}{\lambda}\Delta_b, \quad (3.3)$$

donde λ es la longitud de onda de la luz utilizada y Δ_b es la diferencia de camino óptico entre los frentes de onda Σ_1 y Σ_2 (figura 3.2). Si las amplitudes de las dos ondas son iguales ($a_1 = a_2 = a$), la ecuación 3.2 toma la forma:

$$I = I_{max} \cos^2(\Psi_b/2), \quad (3.4)$$

donde I_{max} es el valor máximo de I ($I_{max} = 4a^2$).

3.2.1. El interferómetro Mach-Zehnder como un interferómetro por desplazamiento lateral de un frente de onda

Uno de los principales diagramas esquemáticos de los componentes ópticos en el interferómetro de Mach-Zehnder se mostró en la figura 3.2. Éste incluye dos divisores de haz y dos reflectores planos (espejos), pero haciendo una variación en la colocación de sus componentes se podría trabajar con la interferometría por desplazamiento se muestra en la figura 3.3.

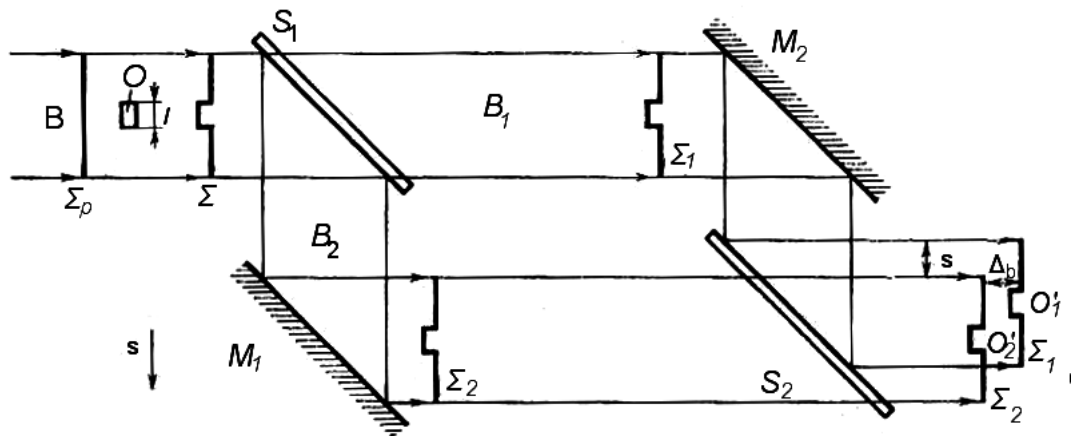


Figura 3.3: Interferómetro Mach-Zehnder como sistema de interferencia por desplazamiento lateral [9].

La única diferencia consiste en que el espejo M_1 se desplazó una distancia s , el frente de onda que atraviesa el objeto O bajo examinación no recorre

el mismo camino en los dos haces divididos, pero está localizado dentro del haz original (B), el cual aún no ha sido duplicado en las dos componentes (B_1 y B_2). Esta modificación aparentemente sencilla trae consigo algunas consecuencias muy significativas, especialmente con respecto al contraste de interferencia diferencial, lo cual se abordará más adelante. El interferómetro por desplazamiento no produce un frente de onda de referencia, sino dos frentes de onda idénticos Σ_1 y Σ_2 provenientes del objeto, originados a partir de un sólo frente de onda Σ_p que incide sobre el objeto y al pasar a través de él, éste se deforma convirtiéndose en el nuevo frente de onda Σ .

En el diagrama, básicamente los frentes de onda Σ_1 y Σ_2 son recombinados de tal manera que sólo haya un desplazamiento lateral con una distancia s relativa entre cada rayo, como se muestra en la esquina inferior derecha de la figura 3.3; es por eso que se dice que no hay frente de onda de referencia, puesto que ambos se verían como una referencia mutuamente. Dependiendo de la razón del desplazamiento (s) y la altura (l) del objeto bajo examinación, uno obtiene un desplazamiento completo ($s > l$), un desplazamiento parcial ($s < l$), o lo que se llama un *desplazamiento diferencial* ($s \ll l$) [14].

Para este caso la distribución de intensidad del patrón de interferencia vendría dado como:

$$I(x, y) = a_1(x, y)^2 + a_2(x, y)^2 + 2a_1(x, y)a_2(x, y)\cos[\Psi_b(x, y) + \Psi_b(x + s, y)]. \quad (3.5)$$

Suponiendo que el desplazamiento lateral está dado sobre el eje x .

3.2.2. Microscopía DIC como método para obtener gradientes de fase

Ahora se presentará a grandes rasgos lo que sucede en una situación donde el desplazamiento es muy pequeño (diferencial) con respecto a la dimensión lateral del objeto que se está examinando ($s \ll l$). Sin pérdida de generalidad, consideremos una pequeña gota de algún líquido, la cual tendría la forma de una lente plano convexa (figura 3.4). Después de atravesar la gota, el frente de onda plano Σ_p toma la forma de la superficie curva, convirtiéndose en Σ , el cual va a ser separado en dos frentes de onda Σ_1 y Σ_2 .

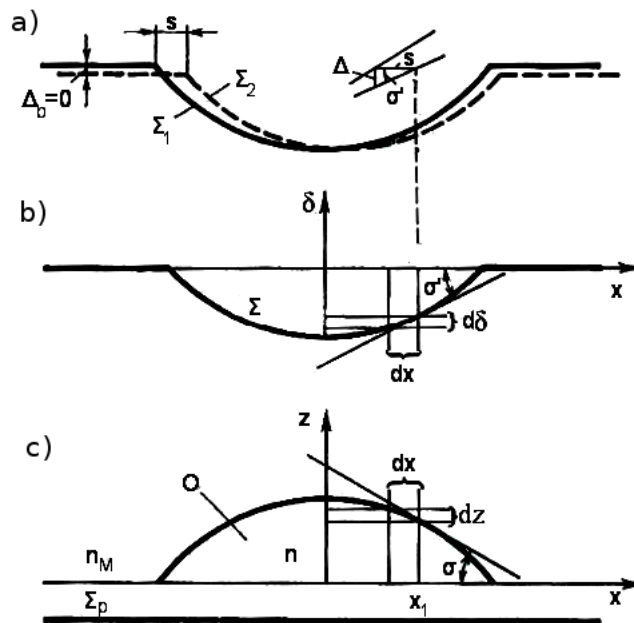


Figura 3.4: Ilustración de a) los frentes de ondas separados por el microscopio DIC Σ_1 y Σ_2 , b) el frente de onda saliente de la gota Σ , y c) un frente de onda atravesando una gota Σ_p [14].

Considerando el sistema cartesiano en las figuras 3.4a y 3.4b, x , z y x , δ están asociados con la misma sección axial del objeto O y el frente de onda Σ . Estamos tomando que la coordenada horizontal x es paralela a la dirección del desplazamiento y expresa la dimensión lateral del objeto. Mientras que las coordenadas verticales z y δ pasan a través del vértice del objeto y expresan el grosor y la diferencia de camino óptico, respectivamente. Veremos que las últimas dos cantidades no son constantes pero están en función de x .

Sabemos que un cambio de x en una cantidad infinitesimal dx , causa un cambio de δ por:

$$d\delta = (n_M - n)dz, \quad (3.6)$$

donde n es el índice de refracción del objeto, n_M es el del medio que rodea al objeto, y dz denota el cambio en el grosor del objeto correspondiente a dx . De la geometría de la figura 3.4c podemos deducir también que:

$$\frac{dz}{dx} = \tan\sigma. \quad (3.7)$$

Aquí σ es la pendiente de la superficie del objeto en el punto x_1 . Ahora, combinando estas dos últimas ecuaciones podemos obtener que:

$$\frac{d\delta}{dx} = (n_M - n)\tan\sigma. \quad (3.8)$$

Por otra parte, de la geometría de la figura 3.4b uno tiene:

$$\frac{d\delta}{dx} = \tan\sigma'. \quad (3.9)$$

y

$$\tan\sigma' = \frac{\Delta}{s}, \quad (3.10)$$

donde σ' es la pendiente de los frentes de onda Σ , Σ_1 , y Σ_2 en la zona punteada (x_1), s es el desplazamiento de frente de onda, y Δ es la diferencia de camino óptico entre los frentes de onda de interferencia Σ_1 y Σ_2 alrededor de x_1 (se está asumiendo que el retraso sistemático ($\Delta_b = 0$)). Al combinar las últimas dos ecuaciones, tenemos:

$$\Delta = s \frac{d\delta}{dx}. \quad (3.11)$$

Esta es una relación muy importante porque muestra que la diferencia de camino óptico Δ , entre dos frentes de onda infinitesimalmente separados por un desplazamiento, no se expresa en términos de la diferencia de camino óptico δ en el espécimen, pero si es directamente proporcional a la derivada $d\delta/dx$, es decir, al gradiente de δ en la dirección del desplazamiento del frente de onda, es por eso que recibe el nombre de “interferencia diferencial” o “contraste de interferencia diferencial” [14].

Si el retraso sistemático $\Delta_b \neq 0$, la ecuación 3.11 toma la forma de:

$$\Delta = \Delta_b + s \frac{d\delta}{dx}. \quad (3.12)$$

Por lo tanto, la distribución de intensidad normalizada (Ec. 3.4) está dada por:

$$I_{O'} = \cos^2 \left[\frac{\pi}{\lambda} \left(\Delta_b + s \frac{d\delta}{dx} \right) \right]. \quad (3.13)$$

De las ecuaciones 3.8 y 3.11 se sigue que:

$$\tan\sigma = \frac{\Delta}{s(n_M - n)}. \quad (3.14)$$

Al medir Δ , se puede estimar la pendiente σ de un objeto si s y $n_M - n$ son conocidas. O de igual manera, si σ es conocida, el índice de refracción relativo $n_M - n$ puede ser determinado.

3.2.3. Configuración óptica del microscopio DIC

En la microscopía DIC es fundamental colocar un polarizador seguido de un prisma de Wollaston (prisma divisor) que divide al haz proveniente de la fuente en dos haces idénticos ortogonalmente polarizados separados por una distancia llamada de desplazamiento, este prisma es colocado debajo de un condensador que colima el haz de luz hacia el espécimen bajo estudio[15]. Posteriormente los rayos se hacen pasar por un objetivo, donde a su salida se ubica un segundo prisma, a menudo referido como prisma recombinador, el cual es seguido por un analizador. Todas estas componentes están orientadas como se muestran en la figura 3.5b), donde las direcciones de las vibraciones de luz en el analizador y en el polarizador están cruzados.

El prisma recombinador es utilizado como un compensador; este prisma es similar al prisma divisor y está orientado de tal manera que anule la diferencia de camino óptico entre las dos ondas de luz que se forman al ser cortados por el prisma divisor. Las posiciones axiales de estos dos prismas están ajustados para poner sus planos de interferencia a cierta distancia para que coincida con el punto focal frontal F_c del condensador y el punto focal trasero F_{Ob} del objetivo, respectivamente [16].

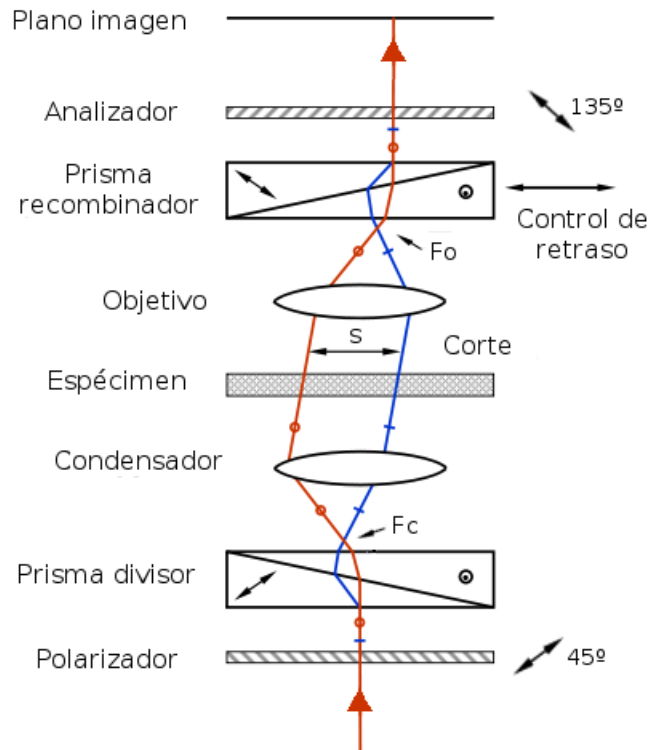


Figura 3.5: El sistema del microscopio DIC utilizando dos prismas de Wollaston [17].

Después de que emergen los rayos del prisma divisor de Nomarski en su plano de interferencia, los frentes de onda ordinario y extraordinario son enfocados por las lentes que componen el condensador y viajan a través del espécimen antes de ser recolectados por el objetivo. A lo largo de sus trayectorias entre el condensador y el objetivo, los frentes de onda permanecen paralelos uno con otro y son separados por una *distancia de desplazamiento* derivada de las características geométricas del prisma condensador [18]. La separación espacial entre los frentes de onda está diseñada para ser ligeramente menor (en algunos casos igual) a la resolución lateral del microscopio, es por eso que esta técnica es referida como interferencia diferencial.

En el momento en que los frentes de onda se encuentran con un gradiente de fase presente en el espécimen mientras cruzan del condensador hacia el objetivo, una distorsión de frente de onda es introducida en las ondas y son sometidas a un corrimiento de fase a lo largo del eje del desplazamiento, por lo que atravesarán un camino óptico ligeramente distinto. Una vez que llegan al prisma recombinador, el par de frentes de onda, que ya vienen con un corrimiento de fase son recombinados. Debido a que el vector eléctrico de los frentes de onda resultantes, el cual ya no es plano sino que lleva una trayectoria elíptica, sólo una porción de las ondas pasará a través del analizador y se superpondrán los haces linealmente polarizados, los cuales tendrán una amplitud finita y suficiente para generar intensidad en el plano imagen [19].

En resumen, los gradientes de camino óptico en el espécimen inducen un corrimiento de fase en los frentes de onda cortados por el prisma condensador y tienen trayectorias paralelas entre sí. Estos corrimientos de fase son traducidos en una diferencia de fase debido al prisma de Nomarski. Cuando el prisma objetivo compensa exactamente los efectos del prisma condensador, el analizador bloquea todos los frentes de onda originados por todos los puntos del campo carente de corrimientos de fase (donde el espécimen no presenta gradientes de fase). El fondo resultante observado en el campo de visión es oscuro (por la extinción de la luz) con la excepción de algunas regiones del espécimen que tienen cambios en su índice de refracción o en su gradiente de fase, lo cual aparenta ser más brillante.

3.2.4. Implementación de Carré en el DIC

En la práctica, el prisma objetivo de Nomarski puede ser desplazado lateralmente a lo largo del eje del desplazamiento, con lo que se desplazará

uniformemente el corrimiento de fase relativo entre los frentes de onda ordinario y extraordinario al pasar por el espécimen. El hecho de introducir un corrimiento de fase entre el frente de onda ordinario con respecto al extraordinario al trasladar el prisma recombinaor es a menudo llamado como *introducción a una retardación sistemática* en la microscopía DIC y se debe a las características ópticas de los prismas de Nomarski [18], lo cual se explica con más detalle en el Apéndice .1.

La imagen final producida por el microscopio DIC puede expresarse de la siguiente manera [20]:

$$I(x, y) = a(x, y) + b(x, y)\cos[\phi(x + s, y) - \phi(x, y) + \beta]\}, \quad (3.15)$$

donde I es la intensidad medida, ϕ es la fase del objeto, y β es una fase introducida por el sistema que puede deberse al camino óptico que recorren los rayos a través de todo el sistema después de atravesar el espécimen. Esta ecuación es considerando que el eje del desplazamiento coincide con el eje x , puesto que la diferencia entre el rayo de prueba y el rayo de referencia recorren un punto diferente, el cual sólo está alejado una distancia s con respecto del otro. Como ya se ha mencionado, el desplazamiento es del orden o menor a la resolución del microscopio, por lo que se puede realizar la siguiente operación.

$$\phi(x + s, y) - \phi(x, y) = s \frac{\phi(x + s, y) - \phi(x, y)}{s} \approx s \frac{\delta\phi(x, y)}{\delta x}. \quad (3.16)$$

Renombrando:

$$\phi(x, y) = s \frac{\delta\phi(x, y)}{\delta x}. \quad (3.17)$$

Donde $\Phi(x, y)$ es el producto de la distancia de separación debido al desplazamiento y el gradiente de fase. Con esta sustitución se obtiene la ecuación final:

$$I(x, y) = a(x, y) + b(x, y)\cos[\phi(x, y) + \beta], \quad (3.18)$$

Nótese que la ecuación 3.18 es equivalente a la ecuación fundamental para la interferometría de fase (ecuación 2.7). Para resolverla se recurre al algoritmo de Carré, como se sabe, esta estrategia requiere una serie de interferogramas, en este caso imágenes del DIC, donde la fase de referencia es variada. Además se debe recordar la restricción de que para este algoritmo se requiere emplear un corrimiento lineal de fase 2β entre cada imagen.

Además, puede notarse que empleando el algoritmo de Carré se está recuperando el gradiente de la fase en la dirección del eje x , por lo que para alcanzar el valor de la fase absoluta de espécimen será necesario caracterizar la muestra tanto para la dirección x como en la del eje y y posteriormente aplicar un método de integración que nos permita obtener la integral de estas dos imágenes, para ésto se utiliza un algoritmo denominado *método de Fried* [21]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que se debe aplicar un último cálculo antes de poder llevar a cabo la integración. Aplicando las siguientes funciones [22]:

$$\frac{\delta\Phi_x(x, y)}{\delta x} = \frac{\phi_x(x, y)}{s} \quad \& \quad \frac{\delta\Phi_y(x, y)}{\delta x} = \frac{\phi_y(x, y)}{s} \quad (3.19)$$

En donde s representa el valor del desplazamiento en nuestro microscopio. En el siguiente capítulo se discute acerca de cómo se va a llevar a cabo el método de integración de los gradientes de fase que se está analizando para recuperar la fase absoluta del espécimen.

Capítulo 4

Recuperación de fase a partir de gradientes

En el capítulo anterior se introdujo la idea de adquirir información de la derivada de la fase de un frente de onda a partir de la microscopía DIC. En este capítulo se presenta una descripción del método de integración utilizado para recuperar la fase absoluta del espécimen (método de Fried), a partir de las imágenes obtenidas directamente del DIC.

4.1. Algoritmo de Fried

La reconstrucción de un frente de onda a partir de las mediciones de sus derivadas es un problema de interés actual. Aquí se muestra un reconstructor en particular, llamado algoritmo de Fried [23], éste puede aplicarse a imágenes de grandes dimensiones (millones de píxeles) para recuperar la fase original. A pesar de esto, al programar este reconstructor, la tarea es de tal tamaño que el kernel reconstructor crece a la cuarta potencia del número de píxeles que

componen uno de los lados de la imagen, es por esto que se vuelve problemático cuando se trabaja con imágenes muy grandes.

Los arreglos de datos muy grandes son tratados segmentando la imagen de las derivadas en lo que serían pequeños mosaicos, aplicando el algoritmo de Fried y acoplando los mosaicos para reconstruir la imagen de fase completa.

Consideremos la imagen de un objeto de fase obtenida directamente del microscopio DIC, de la ecuación 3.19 sabemos que esta imagen representa la derivada de la fase (Dx y Dy) del objeto bajo estudio. La figura 4.1 muestra una porción de dicha imagen, donde el píxel (i, j) contiene información de la derivada en esa posición de la imagen y $\Phi_{i,j}$ representa la fase absoluta asociada con cada píxel.

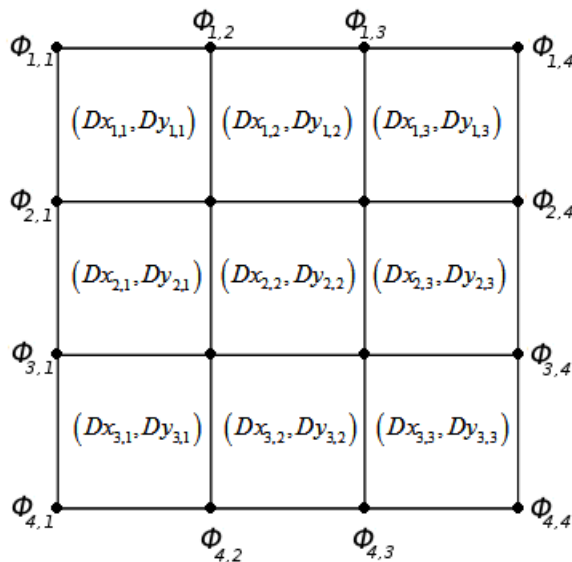


Figura 4.1: Arreglo de píxeles de 3 x 3 para trabajar con el algoritmo de Fried.

La ecuación 4.1 muestra la relación entre la fase absoluta (Φ) y su derivada correspondiente tanto en la dirección x (D_x) como en la dirección y (D_y) para el

píxel (i, j) -ésimo.

$$\begin{aligned} Dx_{i,j} &= \frac{1}{2s} [(\Phi_{i,j+1} + \Phi_{i+1,j+1}) - (\Phi_{i,j} + \Phi_{i+1,j})], \\ Dy_{i,j} &= \frac{1}{2s} [(\Phi_{i+1,j} + \Phi_{i+1,j+1}) - (\Phi_{i,j} + \Phi_{i,j+1})]. \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$i = 1, 2, \dots, m; \quad y \quad j = 1, 2, \dots, n.$$

Dado que el microscopio DIC proporciona información de D_x y D_y , entonces necesitamos resolver la ecuación 4.1 para obtener la fase del píxel $\Phi_{i,j}$. Para una imagen (DIC) de $N \times N$ píxeles habrá un total de $2N^2$ ecuaciones similares a 4.1 (N^2 ecuaciones para x y N^2 ecuaciones para y), y además tendremos $(N + 1)^2$ valores de fase $\Phi_{i,j}$ (un valor para cada vértice de la figura 4.1).

A partir de este conjunto de ecuaciones 4.1, podemos construir el siguiente sistema matricial:

$$\begin{bmatrix} W_x \\ W_y \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Phi_x \\ \Phi_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} D_x \\ D_y \end{bmatrix} \quad (4.2)$$

o bien,

$$\mathbf{W}\Phi = \mathbf{D}. \quad (4.3)$$

W_x contiene los valores de los coeficiente asociados con las fases absolutas Φ_x y D_x son las derivadas de la fase obtenidas a partir del microscopio. Un ejemplo de este sistema se muestra en la ecuación 4.3.1, para el caso de una imagen de 3×3 píxeles, análogamente se tiene un conjunto de ecuaciones similares en la dirección y . Vale la pena recordar que D_x y D_y son las imágenes obtenidas del microscopio DIC rotadas una respecto de la otra 90° .

$$\mathbf{W}_x = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

$$\Phi_x = \begin{bmatrix} \phi_{11} \\ \phi_{12} \\ \phi_{13} \\ \phi_{14} \\ \phi_{21} \\ \phi_{22} \\ \phi_{23} \\ \phi_{24} \\ \phi_{31} \\ \phi_{32} \\ \phi_{33} \\ \phi_{34} \\ \phi_{41} \\ \phi_{42} \\ \phi_{43} \\ \phi_{44} \end{bmatrix}$$

$$D_x = \begin{bmatrix} Dx_{11} \\ Dx_{12} \\ Dx_{13} \\ Dx_{21} \\ Dx_{22} \\ Dx_{23} \\ Dx_{31} \\ Dx_{32} \\ Dx_{33} \end{bmatrix}$$

$$(4.3.1)$$

A partir de la ecuación 4.3 se obtienen los valores de la fase absoluta dada por:

$$\Phi = \mathbf{W}^{-1} \mathbf{D}. \quad (4.4)$$

Las dimensiones de las imágenes DIC ($m \times n$) deben ser moderadas para permitir que \mathbf{W}^{-1} se pueda computar mediante software comercial. Por ejemplo, si $m = n = 32$ píxeles, entonces \mathbf{W} tendrá dimensiones de 2048×1089 . Matrices de este tamaño o mayores fácilmente pueden desbordar la memoria de una computadora. Es aquí donde surge otro problema al querer integrar la imagen completa utilizando este método.

Para evitar este último problema, en este trabajo proponemos segmentar las imágenes DIC (D_x y D_y) en pequeños mosaicos de tamaño arbitrario, en este caso de 32×32 píxeles para su análisis. Por lo tanto, la matriz de fase es reconstruida individualmente para cada uno de estos mosaicos. Adicionalmente, debe tomarse en cuenta que una constante de integración $c_{u,v}$ que debe estar

asociada con cada mosaico (u, v) y ésto debe ser determinado para lograr acoplar todos los mosaicos y poder construir la imagen final. Estas constantes desconocidas forman una matriz \mathbf{c} que es determinada durante un proceso de recombinación, al que le llamamos *proceso de puntadas*, donde se van acoplando los mosaicos, dicho proceso se explica a continuación.

4.2. Proceso de puntadas

El proceso para acoplar los mosaicos, en los cuales es dividida la imagen DIC, es una de las propuestas más importantes de este trabajo de tesis. Este procedimiento determina las constantes de integración desconocidas para cada mosaico $M_{u,v}$ (figura 4.2(a)). La idea central de este algoritmo es hallar las constantes asociadas a cada mosaico tomando en cuenta el valor promedio de las columnas y filas entre los mosaicos reconstruidos (fase absoluta) que sean contiguos (marcadas en rojo y en azul, respectivamente, en la figura 4.2(a)). Para calcular el promedio $E_{u,v}$ de los valores en la última columna, de nuestro mosaico, se realiza con la siguiente expresión:

$$c_{u,v} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{m+1} (M_{u,v}^{i,n+1}), \quad (4.5)$$

donde $M_{u,v}^{i,n+1}$ denota la última columna de valores de $\Phi(i, j)$ en el mosaico $M_{u,v}$ como se muestra en la figura 4.2(b) marcados por los puntos en rojo.

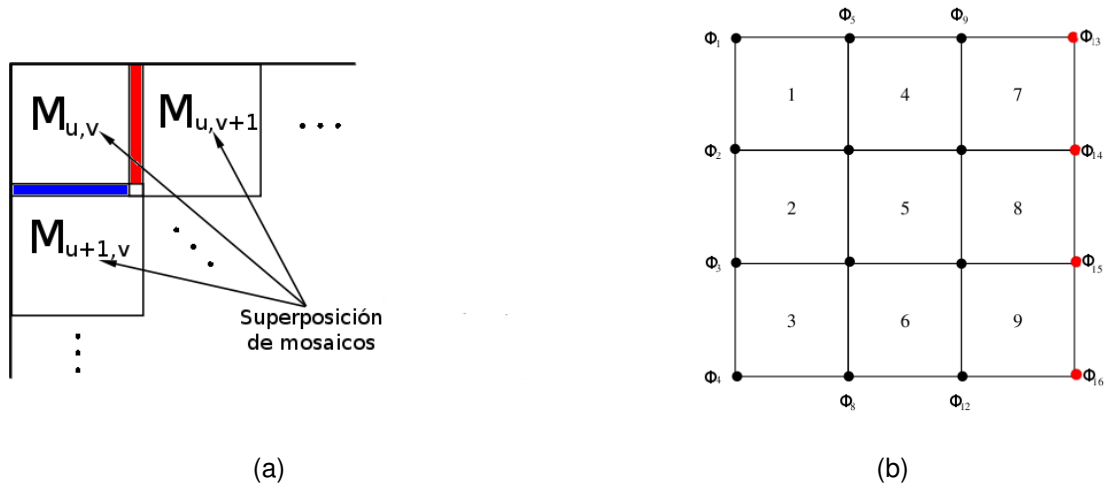


Figura 4.2: a) Mosaicos adyacentes de la imagen y b) representación de los valores para $M_{u,v}$.

Específicamente se calcula la diferencia entre las constantes de integración $c_{u,v+1}$ y $c_{u,v}$ como el promedio entre los valores de los píxeles en el borde derecho del mosaico $M_{u,v}$ y los del borde izquierdo del $M_{u,v+1}$, dado por la siguiente expresión:

$$c_{u,v+1} - c_{u,v} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{m+1} \left(M_{u,v}^{i,n+1} - M_{u,v+1}^{i,1} \right) = EX_{u,v}, \quad (4.6)$$

donde $M_{u,v}^{i,j}$ denota el elemento $\Phi(i, j)$ del mosaico $M_{u,v}$ como se muestra en la figura 4.3.

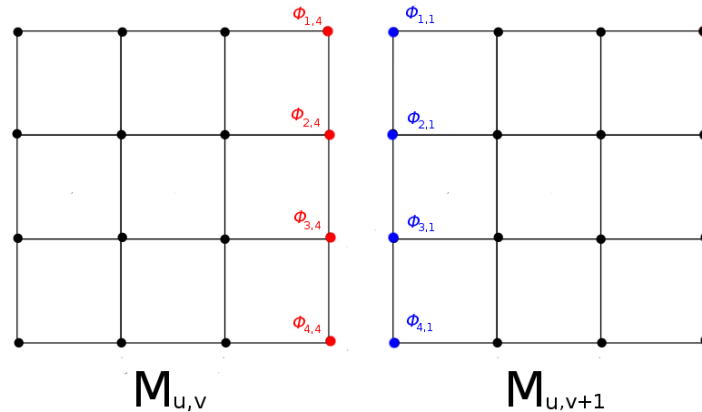


Figura 4.3: Representación de dos mosaicos horizontalmente adyacentes.

Similarmente, la diferencia promedio ($Ey_{u,v}$) que hay entre los mosaicos que son verticalmente adyacentes se calcula como:

$$c_{u+1,v} - c_{u,v} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^{n+1} (M_{u,v}^{m+1,j} - M_{u+1,v}^{1,j}) = Ey_{u,v}. \quad (4.7)$$

Este arreglo de ecuaciones puede ser reescrito de manera matricial como:

$$\begin{bmatrix} V_x \\ V_y \end{bmatrix} \mathbf{c} = \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \end{bmatrix}, \quad (4.8)$$

o bien,

$$\mathbf{Vc} = \mathbf{E}. \quad (4.9)$$

En este caso, la matriz \mathbf{V} tiene sólo valores de ± 1 en algunas de sus entradas y corresponden a los coeficientes de la matriz \mathbf{c} , y es determinada por las ecuaciones 4.6 y 4.7. Por ejemplo, para un arreglo de 3x3 mosaicos, como en la figura 4.4, se tendría la matriz:

$$V_x = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & +1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & +1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & +1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & +1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & +1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & +1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} c_{11} \\ c_{12} \\ c_{13} \\ c_{21} \\ c_{22} \\ c_{23} \\ c_{31} \\ c_{32} \\ c_{33} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} EX_{11} \\ EX_{12} \\ EX_{13} \\ EX_{21} \\ EX_{22} \\ EX_{23} \\ EX_{31} \\ EX_{32} \\ EX_{33} \end{bmatrix} \quad (4.10)$$

Nuevamente, se encuentra el valor de las variables desconocidas (las constantes de integración de los mosaicos $c_{u,v}$) calculando la solución de ajuste encontrando la matriz inversa V^{-1} :

$$\mathbf{c} = \mathbf{V}^{-1} \mathbf{E}. \quad (4.11)$$

$C_{1,1}$	$C_{1,2}$	$C_{1,3}$
$C_{2,1}$	$C_{2,2}$	$C_{2,3}$
$C_{3,1}$	$C_{3,2}$	$C_{3,3}$

Figura 4.4: Mosaicos acoplados con el proceso de puntadas.

De esta forma se va haciendo el ajuste para que los mosaicos se vayan empatando haciendo que las constantes de integración para cada mosaico se vayan compensando como se muestra en la figura 4.4, de manera que al final de todo el proceso se obtenga la imagen final con una constante de integración que abarque todo el mapa de la imagen.

En el capítulo siguiente se muestran los resultados experimentales para la reconstrucción de un objeto de fase a partir los métodos descritos en este capítulo. Esta propuesta está sometida a revisión en JOSA:A como “Experimental validation of phase using Nomarski microscopy with an extended Fried algorithm”.

Capítulo 5

Resultados experimentales

En este capítulo se implementan experimentalmente cada uno de los métodos mencionados anteriormente: método de Carré para procesar las imágenes del DIC, algoritmo de Fried para recuperar la fase absoluta y el método de puntadas para ensamblar la imagen de fase completa. Estas técnicas se implementan en un objeto de fase conocido.

5.1. Arreglo experimental

Se ha mostrado en la sección 3.2.4 que a partir del algoritmo de Carré es posible hacer estimaciones del corrimiento y de las derivadas de la fase en las imágenes del DIC (ecuaciones 2.22 y 2.23), cuyos valores se encuentran codificados en las imágenes que se obtienen del microscopio. Para determinar la cantidad de corrimiento de fase se tomará una serie de imágenes con un microscopio DIC de transmisión (Zeiss Axio Imager) con un objetivo 10x (Epiplan NeoFluar HD DIC 0.3 NA). La luz fue linealmente polarizada para trabajar con un par de prismas de Nomarski, de los cuales, el prisma recombinador fue utilizado

para introducir el retraso sistemático (figura 5.1).

Las imágenes DIC fueron capturadas con una cámara CCD (Nikon Digital Sight) que está equipada con filtros de Bayer y fue configurada de modo que almacenara las imágenes como mapa de bits para su posterior análisis en el paquete de software Matlab. Todas las imágenes tienen un tamaño de 2560 x 1920 píxeles.

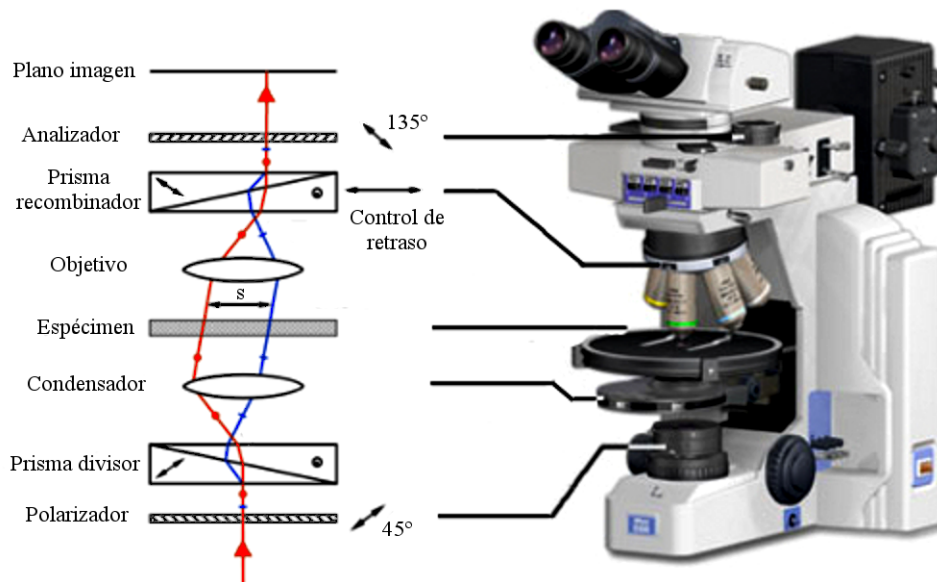


Figura 5.1: Esquema representativo del microscopio DIC.

Se colocó la muestra bajo estudio (cuyas especificaciones se detallan en la siguiente sección) en la montura del microscopio y se procedió a tomar las imágenes. Se sabe que para el análisis se necesita conocer la distancia de separación entre los haces, es decir, el monto de corte s (figura 5.1), el cual ya ha sido caracterizado para cada canal RGB (rojo, verde, azul) de la cámara trabajando con un objetivo 10x [27], estos valores se muestran en la Tabla 5.1 y se expresan en términos de s/λ , de acuerdo con estos datos, el corte (s) tiene un valor aproximado del doble de la longitud de onda de iluminación.

Objetivo	Canal	Valor de corte (s/λ)
10x	Rojo	2.41
	Verde	2.25
	Azul	2.02

Cuadro 5.1: Valores del corte en el microscopio DIC [27].

5.2. Muestras

Como objeto de estudio se empleó un cubreobjetos que contenía unas “escaleras”, cada escalón tenía una altura del orden de nanómetros, estas muestras fueron provistas por el departamento de Física de Portland State University especializado en nanotecnología. Las muestras se fabricaron en una base de vidrio (cubreobjetos) de unos $170 \mu\text{m}$ de espesor (Erie Scientific Gold Seal #3307) depositando un substrato de fluoruro de magnesio en polvo (Johnson Matthey Electronics, Magnesium Fluoride, 98 % Num. #46102) mediante evaporación térmica y se fueron tallando los escalones con ayuda de una navaja colocada en un soporte que permitía desplazarla horizontalmente.

El espesor de cada uno de los escalones fue medido por un microscopio de fuerza atómica (AFM, Park Scientific M5). La figura 5.2 muestra el perfil de una de las muestras obtenido con el AFM. Cada muestra presentaba un diferente número de escalones, en total se contaba con 3 muestras. La tercera ha experimentado una grave desintegración en sus capas debido al agrietamiento por impurezas, esta desintegración podría meter ruido en las mediciones y crear discrepancias en los espesores medidos. La primera y la segunda muestra no presentaban problemas de este tipo.

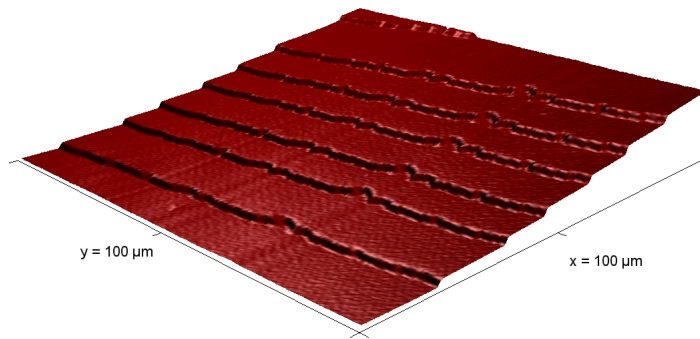


Figura 5.2: Imagen AFM de una de las tres muestras que se reportan en este trabajo.

En el microscopio DIC se utilizaron las tres diferentes muestras, estas tenían dibujada una flecha señalando el lugar del escaneo vía AFM, con lo que se facilitaría comparar los resultados obtenidos con ambos microscopios. A continuación se presenta el espesor acumulado de los escalones en cada una de ellas:

# escalón	1er. muestra (nm)	2da. muestra (nm)	3ra. muestra (nm)
1	58.612 ± 2.892	91.135 ± 32.253	78.378 ± 8.229
2	123.659 ± 14.822	150.666 ± 3.585	129.865 ± 7.477
3	166.986 ± 1.437	221.805 ± 1.53	211.462 ± 9.194
4	240.997 ± 0.199	356.152 ± 4.513	301.103 ± 13.549
5	315.928 ± 1.305		409.132 ± 19.638
6	404.65 ± 1.725		534.4 ± 27.422
7	510.381 ± 2.373		665.414 ± 28.853
8	598.528 ± 5.976		830.906 ± 16.746

Cuadro 5.2: Espesor acumulado de los escalones en las 3 muestras medidas vía AFM.

En las secciones siguientes se presenta, paso a paso, la manera en que se fue desarrollando el experimento.

5.3. Determinación del corrimiento de fase (β) en el microscopio DIC

Como punto de inicio, primero se implementó el método de Carré, para ello se determinó el monto de corrimiento de fase (β) debido al desplazamiento del prisma recombinaor. La posición del prisma recombinaor, y por tanto el corrimiento de fase β , se cambió al girar el tornillo de control ubicado en la muesca que contiene el prisma. Este tornillo no cuenta con graduación, sólo presenta una marca que permite distinguir el momento en que se completa una vuelta.

De esta manera se introdujo el corrimiento de fase necesario tomando en cuenta la restricción del método de Carré de introducir un cambio de fase de 2β , es decir, en este caso equivaldría a darle dos vueltas al tornillo por cada imagen capturada. Puede ser considerado un inconveniente el hecho de que el movimiento del prisma se realice mediante un tornillo, ya que para esta técnica se recomienda un sistema con una alta estabilidad mecánica con el fin de obtener mejores resultados.

La siguiente figura muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas para la primera muestra, nótese la diferencia de fase 2β entre cada imagen (ver ecuación 2.21).

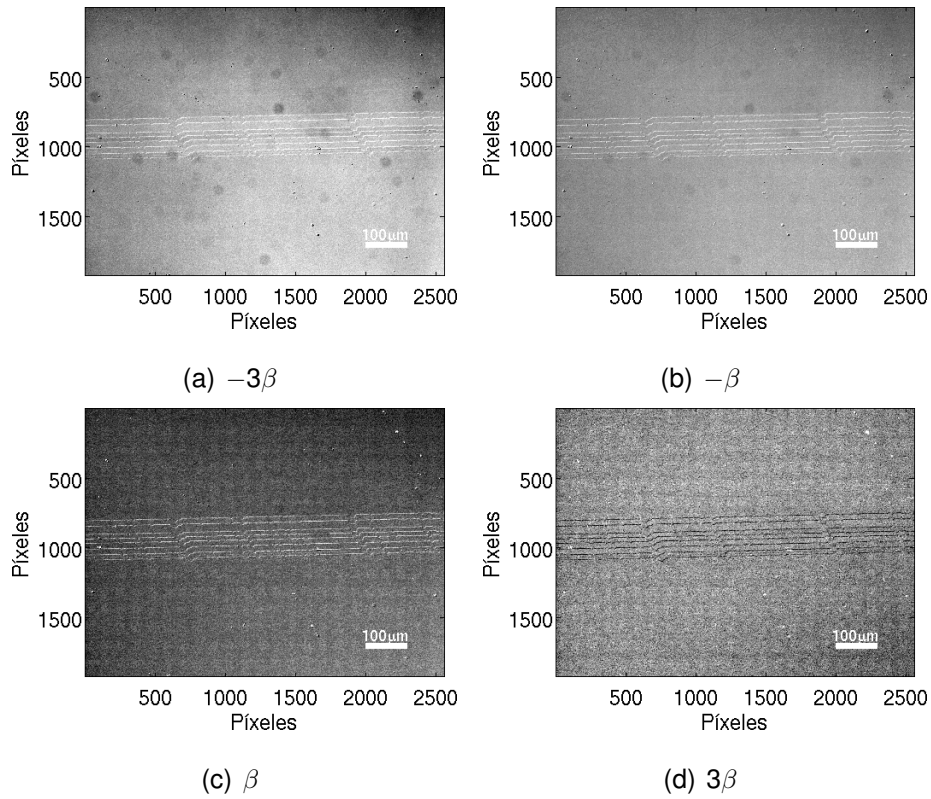


Figura 5.3: Imágenes tomadas para el análisis de Carré con diferentes retrasos de fase.

En las imágenes anteriores se puede ver a simple vista los bordes de los escalones, sin embargo, la imagen misma no nos da una idea de la topología que tiene cada escalón, puesto que sólo se resaltan los lugares donde se encuentran los gradientes de fase. Nótese como varía el contraste de la imagen a medida que se va introduciendo el corrimiento de fase, se debe tener cuidado al procesarlas en caso de que alguna de las imágenes sea muy oscura.

Utilizando estas imágenes se procedió a analizar el comportamiento del retraso introducido en el sistema. La figura 5.4 muestra el mapa de valores de β obtenido a partir de la ecuación 2.22, y de las imágenes mostradas en la figura 5.3.

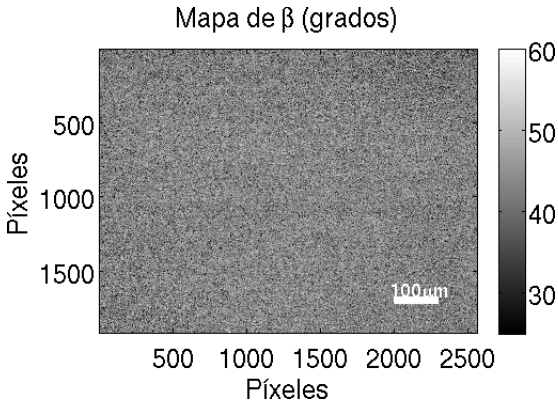


Figura 5.4: Mapa de β (grados) obtenido a partir de las imágenes en la figura 5.3.

En la figura 5.5(a) se muestra la función de distribución de probabilidad (PDF, por sus siglas en inglés) para β , de donde el valor medio de $\beta \approx 45^\circ$, este valor se empleó en la ecuación 2.23 para calcular la derivada de la fase (ϕ).

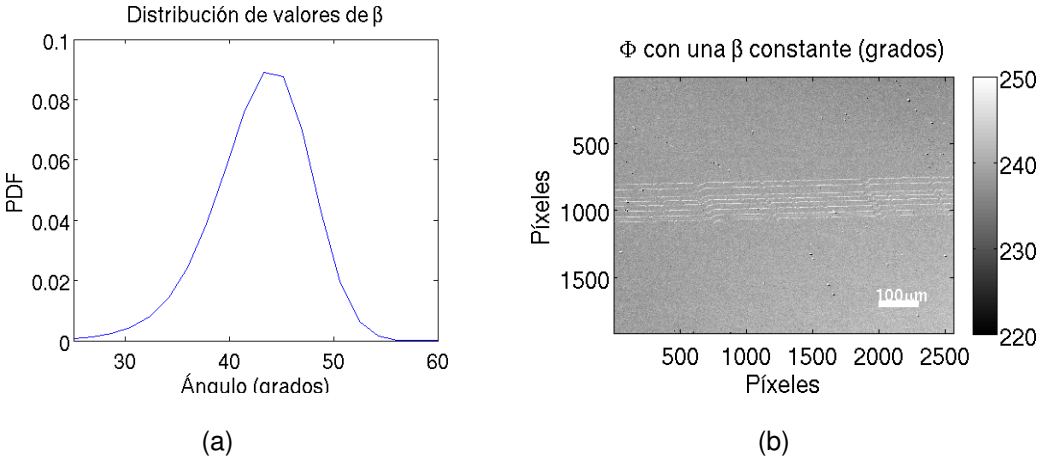


Figura 5.5: a) Distribución de los valores para β y b) el mapa de ϕ utilizando un valor constante para β

5.4. Determinación de los gradientes de fase

Se colocó la muestra en el microscopio y se tomaron las cuatro imágenes necesarias para procesarlas utilizando el algoritmo de Carré, recordando que para esto se requería caracterizar la muestra tanto para la dirección x como en y , simplemente rotando la muestra 90° en nuestro arreglo como se muestra en la figura 5.6 y repitiendo el proceso de corrimiento de fase para adquirir las cuatro imágenes.

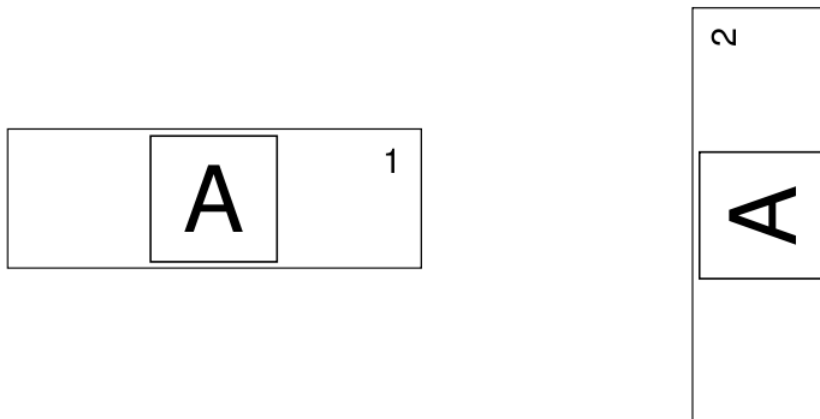


Figura 5.6: Método para obtener los gradientes ortogonales de la imagen DIC.

Sabiendo que estamos obteniendo las imágenes DIC tanto en x como en y (derivadas), debemos rotar una de las imágenes de tal manera que éstas coincidan y se puedan empalmar, es decir, que cada punto correspondiente al gradiente de la fase en x corresponda al mismo punto en la imagen del gradiente de fase en y . De estas imágenes procedemos a recortar un cuadrado de 1200×1200 píxeles, como puede verse en la figura 5.7.

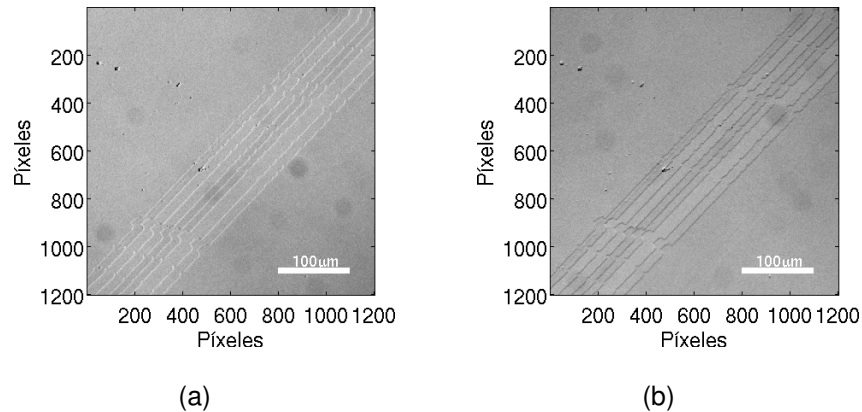


Figura 5.7: Región de interés de las imágenes DIC para el caso a) 0° y b) 90° respecto del sistema de referencia del microscopio.

Las imágenes correspondientes al mapa de β y PDF de la sección recortada se muestran en la figura 5.8. Hay que recordar que se tienen cuatro imágenes (para los diferentes corrimientos de fase: -3β , $-\beta$, β , 3β) tanto para el caso a) como el caso b) de la figura anterior. Se procede a trabajar con el algoritmo de Carré para obtener el valor que tiene el corrimiento de fase (figura 5.8).

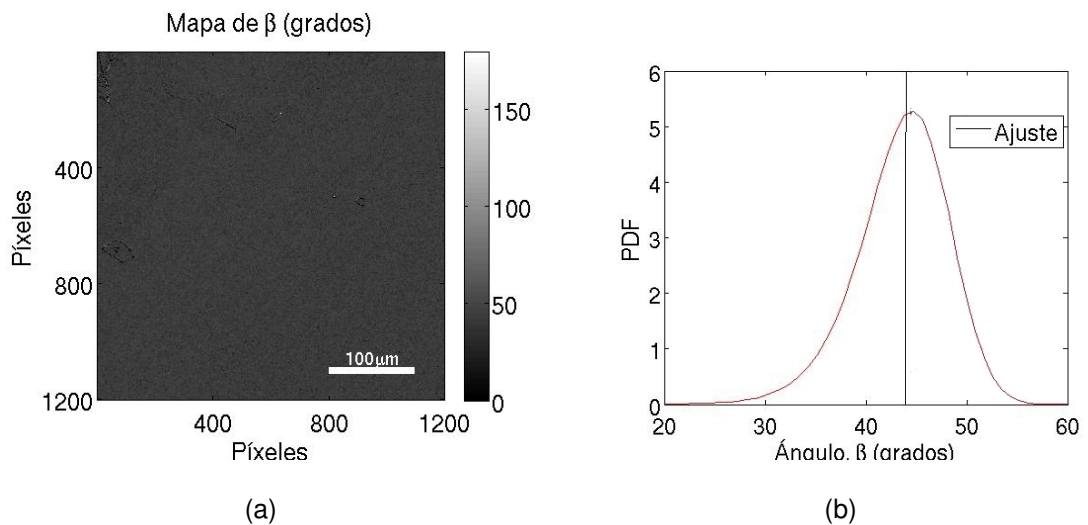


Figura 5.8: a) Mapa final para β y su b) distribución de valores

La figura 5.8(b) muestra el rango de valores que se abarcan en el mapa del

corrimiento de fase, la línea negra vertical muestra el valor medio (44.3°).

El siguiente paso es introducir el valor de β en la ecuación 2.23, para finalmente obtener los mapas de ϕ_x y ϕ_y (figuras 5.9), que como se sabe no son más que las derivadas de la fase del objeto, es por eso que da la apariencia de ser uniforme o constante en casi todo el mapa de la función, ya que se está trabajando con una superficie plana, a excepción de las líneas que se distinguen, las cuales marcan los bordes de cada escalón, en donde se presentan los cambios de fase que existe en esas zonas.

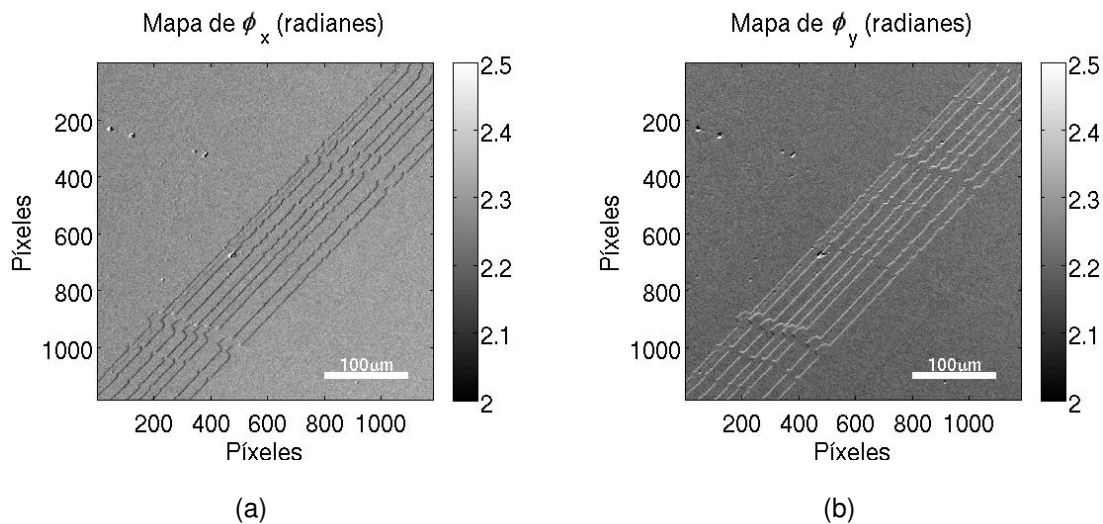


Figura 5.9: Mapas de Φ para los casos a) x y b) y.

Además como se está trabajando con imágenes en dimensiones de píxeles, es necesario pasar a unidades de longitud, esto se logra multiplicando por un factor de conversión entre el número de píxeles y la distancia en micras que representa, para esta resolución el factor es de $200\mu\text{m} = 590\text{px}$. Se asume, de la imagen en la figura 5.9, que el fondo tiene un valor diferente de cero, esto debe corregirse, puesto que al hacer una integración podría alterar el resultado. La constante del fondo se encuentra dentro de la β en la ecuación 3.18, puesto que es una fase adicional que se añade a la fase del objeto y corresponde al camino

óptico recorrido a través del tren de componentes ópticos en el microscopio. En la siguiente sección se discute acerca de cómo se va a llevar a cabo el método de integración de los gradientes de fase que se está analizando para recuperar la fase absoluta del espécimen.

5.5. Implementación del algoritmo de Fried

La constante del fondo para los gradientes de fase es determinada al calcular el valor de una porción de la imagen (rectángulo en las figuras 5.10(a) y 5.10(b)) donde no encontremos variaciones de fase, en este caso se toma una porción del escalón más bajo de los recubrimientos con MgF_2 .

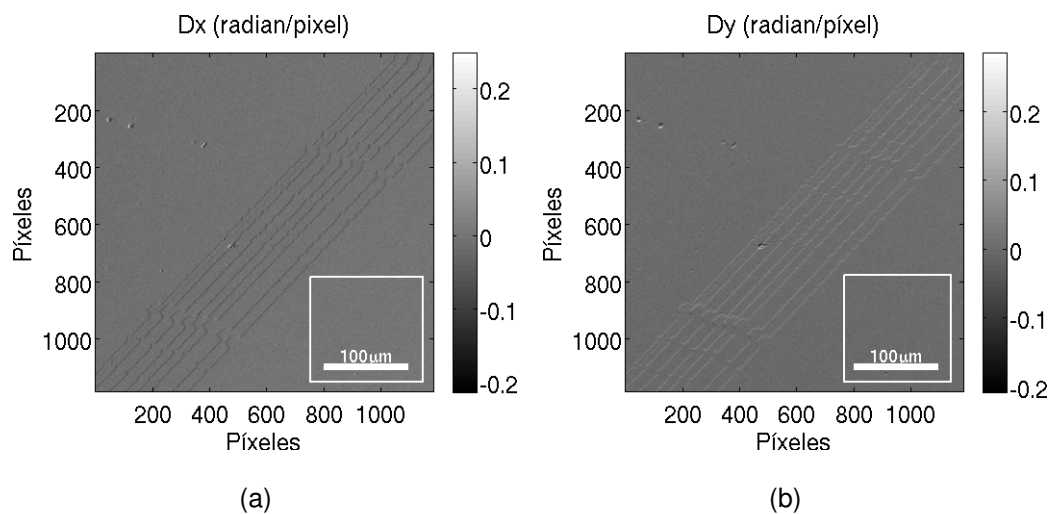


Figura 5.10: Las derivadas de la imagen del espécimen en a)x y b)y. Los cuadrados indican la región que fue sustraída.

Las imágenes D_x y D_y que se muestran en la figura 5.10 fueron divididas en mosaicos de 32x32 píxeles, basándonos en la discusión de la sección 4.1. La fase de cada uno de los mosaicos fue recuperada utilizando la ecuación 4.4, y las constantes desconocidas de integración fueron adquiridas con la ecuación

4.9 y añadidas a los elementos de cada mosaico, los cuales fueron después combinados con el método de puntadas (sección 4.2) para formar la imagen final de la fase absoluta.

Dado que conocemos la altura acumulada, $h(x, y)$, de los escalones medidos vía AFM (Tabla 5.2), podemos calcular la fase absoluta del objeto dada por:

$$\Phi = \frac{2\pi h(x, y)}{\lambda} [n(\lambda) - 1], \quad (5.1)$$

donde $n(\lambda)$ es el índice de refracción del Fluoruro de Magnesio [25], y λ la longitud de onda de iluminación. La ecuación 5.1 nos permitirá comparar las fases medidas a través del microscopio DIC y las fases obtenidas con el AFM.

5.6. Resultados para la muestra 1

Como se ve en la figura 5.11, se muestran las imágenes de fase obtenidas con el AFM (figura 5.11(a)) y con nuestra propuesta (figura 5.11(b)). Es importante resaltar que dada la resolución del AFM, no nos permite obtener imágenes de mayor tamaño que la mostrada en la figura 5.11(a), nuestra propuesta no tiene esta limitante y sólo para fines de comparación se hizo un recorte para abarcar el mismo tamaño de la imagen en el AFM.

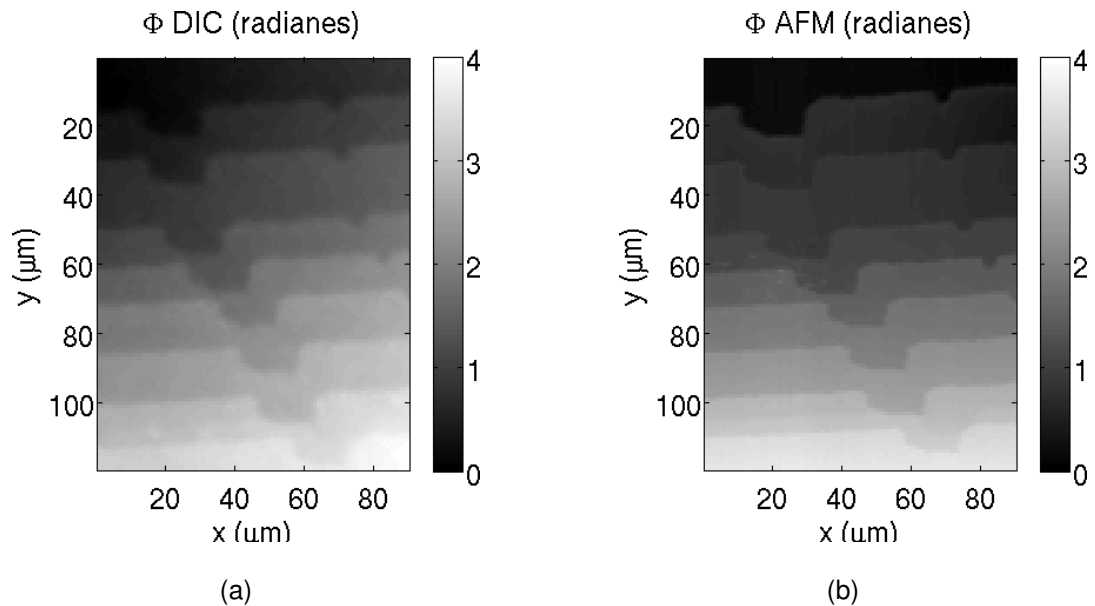


Figura 5.11: Comparación entre las fases estimadas del a)DIC usando luz blanca y el b)AFM.

Se puede notar que la calidad de la imagen recuperada con el microscopio DIC ha perdido calidad debido a los diferentes procesos y aproximaciones por las que ha sido sometida, además hay que tomar en cuenta que las imágenes tuvieron que ser giradas para alcanzar este resultado. Sin embargo, se llega a ver una buena similitud entre ambos resultados.

Para hacer una comparación más cuantitativa entre las figuras 5.11(a) y 5.11(b) se hizo un corte en ambas imágenes en la coordenada $x = 40\mu m$, dichos cortes se muestran en la figura 5.12(a), cabe aclarar que la curva correspondiente al DIC fue extraída a partir del análisis únicamente para el canal rojo de la CCD (figura 5.11(b)).

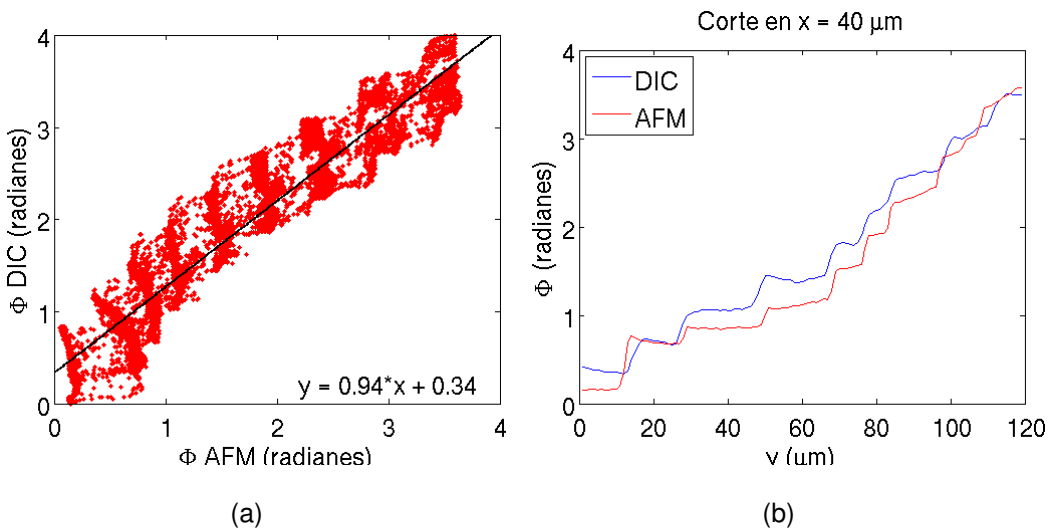


Figura 5.12: a)Correlación entre los resultados y b)corte de las imágenes en $x = 40\mu\text{m}$.

Podemos notar de las figuras 5.12(a) y 5.12(b), que tenemos un buen resultado utilizando nuestra propuesta, ya que estamos recuperando la forma y los valores para cada escalón, como se muestra en Fig. 5.12(a). Al graficar punto contra punto para ambas imágenes encontramos que tenemos un grado de correlación muy alto entre ambos resultados, este es de alrededor de 0.94, lo que nos dice que tenemos una muy buena aproximación, mientras que el error en la ordenada se puede atribuir a una constante de integración.

Aquí sólo presentamos los resultados utilizando el canal rojo de la CCD, esto es conveniente puesto que sabemos que el valor del corte depende de la longitud de iluminación, y así estamos acortando el ancho de banda para este análisis. Pudimos presentar los resultados para los demás canales pero los resultados son muy similares.

5.7. Resultados para la muestra 2

Previamente puede notarse que los resultados para la muestra 1 son muy buenos, sin embargo, pensamos que podemos mejorar en cierta medida nuestros resultados, para esto implementamos unos filtros de 405nm y 632.8nm. Esto es con la finalidad de reducir el ancho de banda de la fuente y hacer un mejor cálculo para las fases obtenidas con el AFM, al hacer el análisis de la ecuación 5.1. En este caso se utilizó la segunda muestra, la figura 5.13 muestra los resultados para la fase obtenida con el DIC y con el AFM, utilizando el filtro de 405nm.

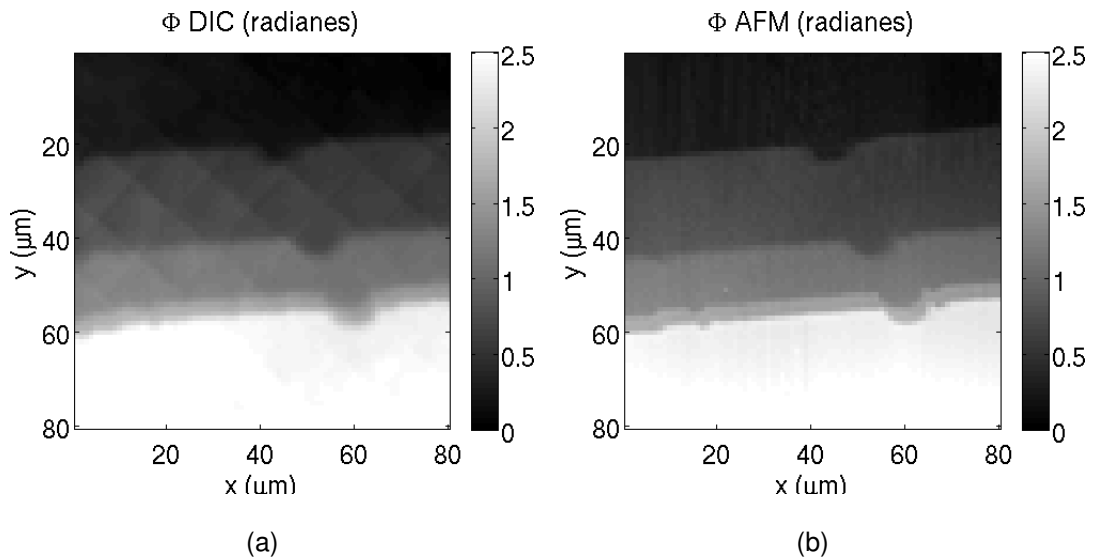


Figura 5.13: Comparación entre las fases estimadas del a)DIC usando filtro de 405nm y el b)AFM para la segunda muestra.

A simple vista puede notarse como mejora el resultado, puesto que los valores entre las imágenes de la figura 5.13 presentan mayor similitud que el caso anterior. De la misma manera se lleva a cabo la comparación entre ambas imágenes, se hace un corte sobre la coordenada $x = 40$. Además se grafica la correlación punto a punto de ambos resultados. La figura 5.14 muestra los

resultados de estas dos comparaciones.

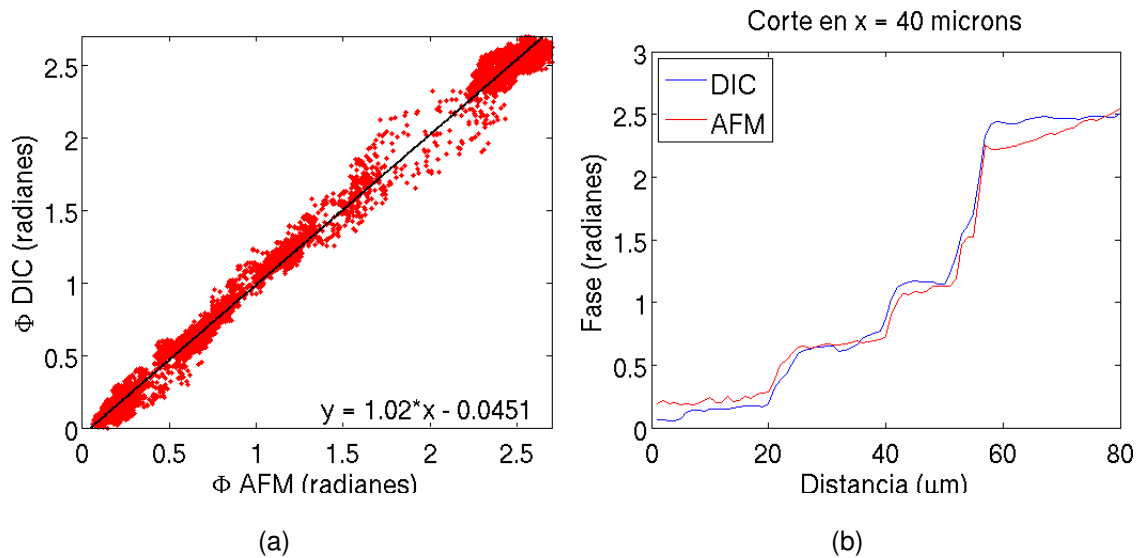


Figura 5.14: a) Correlación entre los resultados y b) corte de las imágenes en $x = 40\mu m$

En este caso podemos notar que la aproximación, tanto la forma como los valores de cada escalón, utilizando el microscopio DIC es muy buena, ya que el grado de correlación es alrededor de 1 y vemos que los puntos en la figura 5.14(a) están mucho menos dispersos que para el caso anterior. Lo que hasta ahora nos dice que esta propuesta funciona para hallar un valor muy preciso de la fase de un objeto que se desee estudiar. Para la tercera muestra ya no se realizó el experimento puesto que la degradación de la muestra era muy alta como para poder estudiarla.

Capítulo 6

Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado una técnica donde un microscopio DIC no modificado puede ser utilizado para proveer información cuantitativa sobre la fase del campo que se ha propagado a través de una muestra delgada. Es de vital importancia tomar en cuenta la correcta calibración del microscopio para obtener un mejor rendimiento y contraste en las imágenes obtenidas. Lo esencial del trabajo es aplicar la técnica de interferometría por corrimiento de fase, como se describió anteriormente, para proveer los gradientes de fase del espécimen en dos componentes ortogonales. Este método de corrimiento fue llevado a cabo al desplazar el prisma superior de Nomarski con ayuda de un tornillo de control.

Se optó por considerar el valor de β como una constante, una vez hecho esto se hizo el cálculo final del gradiente de fase del espécimen en las direcciones ortogonales, tanto para el eje x , como para el eje y . Posteriormente se llevó a cabo la integración de ambas mediciones ortogonales de los gradientes de fase para recuperar la fase absoluta (después de substraer la constante de retraso debido al recorrido total que presenta la luz al pasar por el tren de componentes ópticos del microscopio), lo cual proporciona una información mucho más práctica.

Aquí se propuso el método de puntadas, el cual nos auxilió a recuperar la fase absoluta trabajan con imágenes muy grandes. Este proceso lleva una serie de desventajas, principalmente la laboriosa colección de las ocho imágenes DIC, el proceso de alinear las imágenes, la rotación de la muestra, y la substracción de una constante en los gradientes de fase. Además, este algoritmo en particular para coser, y obtener la imagen resultante, está sujeta a un problema de n^4 del número de píxeles en los mosaicos en que se divide la imagen. Por otra parte, una ventaja es que las matrices de Fried son de baja densidad y sólo necesitan ser invertidas una vez.

En este proyecto se realizaron pruebas con 3 muestras y se fue reduciendo el ancho de banda de la fuente al trabajar con un sólo canal de la CCD y posteriormente añadiendo filtros al arreglo experimental. Como se ve en las figuras 5.14(a) y 5.14(b), la relación entre la fase estimada a través del microscopio DIC y la obtenida a través de un AFM es muy buena, ya que alcanzamos un grado de correlación de 1. Finalmente, se demuestra la validación experimental del método que se propone para cumplir el objetivo propuesto en el trabajo. y han sido sometidos a revisión en JOSA-A como: “Experimental validation of phase using Nomarski microscopy with an extended Fried algorithm” (2012).

6.0.1. Trabajo a futuro

Algunos errores en la reconstrucción de la fase pueden ser atribuidos debido a que el corrimiento de fase que se introduce en el microscopio no es exacto puesto que no está graduado, lo ideal sería añadir un arreglo al microscopio que permita tener un mejor control sobre la diferencia de fase entre el rayo de referencia y el de prueba. Otros efectos pueden ser causados por el proceso

en el que se emparejan los gradientes de las imágenes, ya que no es exacto y el ruido de la imagen puede influir. Los efectos de estos detalles pueden ser caracterizados a través de una simulación utilizando una serie de patrones de interferencia y en términos de una función óptica de transferencia global o local. Los resultados de estos estudios estarán sujetos a una futura publicación.

El método de puntadas descrito en este trabajo sólo es una alternativa reconstruir la imagen de fase. Hay otras opciones que han sido utilizadas que se pretende realizar para desarrollar otro proyecto. Tal como se observa, el algoritmo se presta muy bien para ser aplicado en imágenes de tamaño arbitrario, incluso se podría llevar a cabo con mosaicos que estén compuestas por un menor número de píxeles para lograr un mejor acabado en la imagen final, puesto que se pierde resolución en el resultado debido a este efecto de pixelado.

Se piensa que esta es sólo una primera demostración de lo que podría ser la reconstrucción de la fase absoluta de un objeto análogo a un tejido biológico delgado que se examina con la técnica DIC en combinación con el corrimiento de fase, utilizando un microscopio no modificado.

Apéndice A

.1. Desarrollo de algoritmo de Carré

Como se explica en la sección 2.2.1 se tienen las siguientes ecuaciones con sus respectivos corrimientos de fase de 2β entre cada una:

$$\begin{aligned}I_1 &= I' + I'' \cos(\phi - 3\beta), \\I_2 &= I' + I'' \cos(\phi - \beta), \\I_3 &= I' + I'' \cos(\phi + \beta), \\I_4 &= I' + I'' \cos(\phi + 3\beta).\end{aligned}\tag{1}$$

Ahora se utilizan identidades trigonométricas para reescribir las ecuaciones de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}I_1 &= I' + I''(\cos\phi - \cos 3\beta) + \text{sen}\phi \text{sen} 3\beta, \\I_2 &= I' + I''(\cos\phi \cos\beta) + \text{sen}\phi \text{sen}\beta, \\I_3 &= I' + I''(\cos\phi \cos\beta) - \text{sen}\phi \text{sen}\beta, \\I_4 &= I' + I''(\cos\phi \cos 3\beta) + \text{sen}\phi \text{sen} 3\beta.\end{aligned}\tag{2}$$

Se elimina la variable I' al calcular las diferencias entre las ecuaciones pares como se indica a continuación:

$$\begin{aligned}l_1 - l_4 &= 2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}3\beta, \\l_2 - l_3 &= 2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\beta.\end{aligned}\quad (3)$$

Sustituyendo estos valores en el segundo miembro de la fórmula 2.22 se sigue que:

$$\frac{3(l_2 - l_3) - (l_1 - l_4)}{(l_1 - l_4) + (l_2 - l_3)} = \frac{6l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\beta - 2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}3\beta}{2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}3\beta + 2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\beta}, \quad (4)$$

$$\frac{3(l_2 - l_3) - (l_1 - l_4)}{(l_1 - l_4) + (l_2 - l_3)} = \frac{3\operatorname{sen}\beta - \operatorname{sen}3\beta}{\operatorname{sen}3\beta + \operatorname{sen}\beta}. \quad (5)$$

Aquí se reescribe la ecuación anterior utilizando la siguiente identidad:

$$\begin{aligned}\operatorname{sen}3\beta &= \operatorname{sen}(\beta + 2\beta), \\&= \operatorname{sen}\beta \cos 2\beta + \cos\beta \operatorname{sen}2\beta, \\&= \operatorname{sen}\beta(\cos^2\beta - \operatorname{sen}^2\beta) + \cos\beta 2\operatorname{sen}\beta \cos\beta, \\&= 3\operatorname{sen}\beta \cos^2\beta - \operatorname{sen}^3\beta.\end{aligned}\quad (6)$$

Esta expresión nos lleva a:

$$\frac{3\operatorname{sen}\beta - \operatorname{sen}3\beta}{\operatorname{sen}3\beta + \operatorname{sen}\beta} = \frac{3\operatorname{sen}\beta - 3\operatorname{sen}\beta \cos^2\beta + \operatorname{sen}^3\beta}{3\operatorname{sen}\beta \cos^2\beta - \operatorname{sen}^3\beta + \operatorname{sen}\beta}, \quad (7)$$

$$= \frac{3 - 3\cos^2\beta + \operatorname{sen}^2\beta}{3\cos^2\beta - \operatorname{sen}^2\beta + 1}, \quad (8)$$

$$= \frac{3\operatorname{sen}^2\beta + \operatorname{sen}^2\beta}{3\cos^2\beta + \cos^2\beta}. \quad (9)$$

$$\frac{3(l_2 - l_3) - (l_1 - l_4)}{(l_1 - l_4) + (l_2 - l_3)} = \tan^2\beta. \quad (10)$$

Y vemos que este resultado corresponde a lo esperado utilizando el algoritmo de Carré para calcular el corrimiento de fase β . Para obtener la fase final, se parte de la ecuación 2.23 y se calculan las sumas y diferencias que se encuentran en el segundo miembro de la expresión:

$$\begin{aligned}l_1 - l_4 &= 2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}3\beta, \\l_2 - l_3 &= 2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\beta, \\l_1 + l_4 &= 2l' + 2l'' \operatorname{cos}\phi \operatorname{cos}\beta, \\l_2 + l_3 &= 2l' + 2l'' \operatorname{cos}\phi \operatorname{cos}3\beta.\end{aligned}\tag{11}$$

Sustituyendo:

$$\tan\beta \frac{3(l_1 - l_4) + (l_2 - l_3)}{(l_2 + l_3) - (l_1 + l_4)} = \tan\beta \frac{2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}3\beta + 2l'' \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\beta}{2l' + 2l'' \operatorname{cos}\phi \operatorname{cos}\beta - 2l' - 2l'' \operatorname{cos}\phi \operatorname{cos}3\beta},\tag{12}$$

$$= \tan\beta \frac{\operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}3\beta + \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\beta}{\operatorname{cos}\phi \operatorname{cos}\beta - \operatorname{cos}\phi \operatorname{cos}3\beta},\tag{13}$$

$$= \tan\beta \tan\phi \frac{\operatorname{sen}3\beta + \operatorname{sen}\beta}{\operatorname{cos}\beta - \operatorname{cos}3\beta},\tag{14}$$

Ahora se reescribe la expresión anterior usando la identidad que se presenta a continuación:

$$\begin{aligned}\operatorname{cos}3\beta &= \operatorname{cos}(2\beta + \beta) = \operatorname{cos}2\beta \operatorname{cos}\beta - \operatorname{sen}2\beta \operatorname{sen}\beta, \\&= (\operatorname{cos}^2\beta - \operatorname{sen}^2\beta) \operatorname{cos}\beta - 2\operatorname{sen}^2\beta \operatorname{cos}\beta, \\&= \operatorname{cos}^3\beta - 3\operatorname{sen}^2\beta \operatorname{cos}\beta.\end{aligned}\tag{15}$$

Se obtiene que:

$$\tan\beta \tan\phi \frac{\operatorname{sen}3\beta + \operatorname{sen}\beta}{\cos\beta - \cos3\beta} = \tan\phi \tan\beta \frac{3\operatorname{sen}\beta \cos^2\beta - \operatorname{sen}^3\beta + \operatorname{sen}\beta}{\cos\beta - \cos^3\beta + 3\operatorname{sen}^2\beta \cos\beta}. \quad (16)$$

$$\tan\beta \tan\phi \frac{\operatorname{sen}3\beta + \operatorname{sen}\beta}{\cos\beta - \cos3\beta} = \tan\phi \tan^2\beta \frac{3\cos^2\beta - \operatorname{sen}^2\beta + 1}{1 - \cos^2\beta + 3\operatorname{sen}^2\beta}, \quad (17)$$

$$= \tan\phi \tan^2\beta \frac{3\cos^2\beta + \cos^2\beta}{\operatorname{sen}^2\beta + 3\operatorname{sen}^2\beta}, \quad (18)$$

$$= \tan\phi \tan^2\beta \frac{1}{\tan^2\beta}. \quad (19)$$

Lo que nos lleva a la expresión esperada para calcular la fase ϕ mediante el algoritmo de Carré.

$$\tan\beta \frac{3(I_1 - I_4) + (I_2 - I_3)}{(I_2 + I_3) - (I_1 + I_4)} = \tan\phi. \quad (20)$$

.2. Prismas de Wollaston y de Nomarski

Los prismas birrefringentes de Wollaston y/o de Normarski son insertados en el camino óptico con su eje de corte orientado con un ángulo de 45° con respecto al eje del plano de vibración del polarizador y el analizador. Los prismas están compuestos por un par de cuñas hechas de un material birrefringente cuyos ejes ópticos deben tener orientaciones perpendiculares para producir un prisma de Wollason (o de Nomarski). Estas cuñas están pegadas por la parte de la hipotenusa para generar una sola placa en la cual el eje óptico de la primera cuña es perpendicular al de la segunda. Cuando los frentes de onda linealmente polarizados inciden en el primer prisma (orientado con su eje óptico a un ángulo de 45° con respecto a la polarización de la luz) del condensador, son divididos en

dos ondas separadas y ortogonales, los cuales son denominados como la onda *ordinaria* y *extraordinaria* [27].

Las componentes del frente de onda ordinaria y extraordinaria mutuamente perpendiculares tienen la misma amplitud y viajan en la misma dirección al atravesar la primera mitad del prisma de Wollaston. Sin embargo, las ondas se propagan a distintas velocidades, lo cual viene siendo definido por las propiedades a lo largo del eje *rápido* y el eje *lento* de la cuña inferior birrefringente. La onda ordinaria procede a atravesar el prisma a través del eje rápido (teniendo un menor índice de refracción), mientras que el rayo extraordinario viaja a través del eje lento, el cual tiene un índice de refracción más alto. La diferencia en el índice de refracción necesario entre las cuñas para producir un prisma de Wollaston es del 0.6 por ciento.

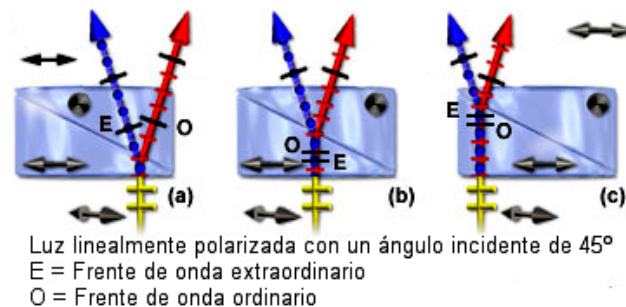


Figura 1: Diagrama esquemático del retraso de fase producido por un prisma de Wollaston.

Una división angular o un corte de los frentes de onda ocurre debido a la unión entre las cuñas que conforman el prisma, ya que las ondas son espacialmente separadas por un ángulo definido como *ángulo de corte*. En esta frontera, las ondas ordinarias y extraordinarias cambian de “identidad” [27] (figura 1). Uno

de los frentes de onda (el ordinario) se propaga desde un medio de menor índice de refracción hacia un segundo medio (la cuña superior) de mayor índice de refracción y ésto hace que se doble hacia la normal (perpendicular al eje óptico de la cuña) de acuerdo con la Ley de Snell. El segundo frente de onda (el extraordinario) al dejar el medio con un alto índice de refracción y entrar al segundo medio con menor índice de refracción, el frente de onda se desvía alejándose de la normal, pero con el mismo ángulo que el primer frente de onda.

El ángulo de corte y la distancia de separación es constante para todas los frentes de onda incidentes de la cara del prisma, a menos que entren desde otro punto. La dirección del corte del frente de onda es definido por el *eje de corte* del prisma, el cual tiene depende del plano del prisma de Wollaston, y es paralelo al eje óptico del prisma inferior como se muestra en la figura 1. Como resultado, el plano de vibración de uno de los frentes de onda que entra al prisma de Wollaston estará orientado paralelamente a la dirección del eje de corte, mientras el otro estará perpendicular a este eje. El ángulo de corte está determinado por el diseño de las componentes del prisma (el ángulo de las cuñas, el cual es menor a un grado de arco) y no puede ser ajustado en el microscopio. Sin embargo, la distancia de corte es tan diminuta (típicamente del orden de un micrómetro) que no es observable la separación del rayo cuando emerge del prisma.

Durante el recorrido a través de la cuña inferior del prisma de Wollaston, los frentes de onda ordinario y extraordinario experimentan diferentes índices de refracción, como se discutió más arriba. Ésto lleva a que el rayo ordinario se propague a través del cristal con una velocidad más alta que la del frente de onda extraordinario. Cuando los frentes de onda intercambian identidades en la interfase entre la cuña inferior y la cuña superior, el frente de onda ordinario se convierte en el frente de onda extraordinario, y viceversa. Además, los frentes de onda están sometidos a un corrimiento de fase en la mitad inferior del prisma

(debido a la diferencia en el índice de refracción) que es compensada por la mitad superior sólo cuando los caminos geométricos tanto de la mitad inferior como la superior del prisma de Wollaston son idénticos (figura 1).

Las ondas que atraviesan el prisma fuera de la zona central experimentan un trayecto más largo en el prisma inferior antes de ser cortados (figura 1(c)), o en el prisma superior después de ser cortados (figura 1(a)), antes de salir. La distancia recorrida que hacen, a lo largo de una cuña del prisma, los frentes de onda (sea el ordinario, figura 1(a), o el extraordinario, figura 1(a)) termina por llegar a la interfase prisma-aire. Y que al final del prisma, el frente de onda extraordinario emerge adelantando al frente de onda ordinario, mientras que a la correspondiente posición del final, el frente de onda ordinario sale del prisma antes que el frente de onda extraordinario.

Si el frente de onda incidente en el prisma de Wollaston está polarizado en una orientación paralela al eje de corte, la división ortogonal del frente de onda no ocurriría y sólo emergería luz linealmente polarizada del prisma. De la misma manera, si el frente de onda polarizado incidente está orientado perpendicularmente al eje de corte del prisma, también emergería sin ninguna alteración respecto a su orientación. La situación ideal (y necesaria para la microscopía de interferencia diferencial de contraste) ocurre cuando el frente de onda polarizado incide con una orientación a un ángulo de 45° con respecto al eje de corte del prisma.

El vector eléctrico linealmente polarizado de la luz que entra a este ángulo es bisecado en dos componentes vectoriales, cada plano de vibración, tanto en el plano del eje rápido como el del lento, tienen una fracción de la amplitud del frente de onda original. Tanto el prisma de Wollaston como el de Nomarski poseen propiedades de acuerdo a su orientación. Un rayo de luz colimado linealmente

polarizado entra al lado opuesto del prisma (está vez desde arriba) a un ángulo de 45° que también producirá un frente de onda extraordinario y ordinario. Sin embargo, la polarización de las ondas será revertida.

Añadiendo un segundo prisma de Wollaston o de Nomarski por arriba del primero se compensará el corrimiento de fase al que se someten los rayos al cruzar por completo el espesor del primer prisma, cabe mencionar que este efecto puede sólo puede ser observado si los dos prismas empleados en el experimento tienen el mismo ángulo de corte. Al trasladar uno de los dos prismas lateralmente con respecto al otro, un *retardo sistemático* uniforme, o un cambio en la longitud de onda, será introducido entre los dos haces. Al desplazar el prisma en una dirección hará que se oscurezca o se ilumine más la imagen resultante.

Las franjas de interferencia observadas en un prisma de Nomarski pueden ser observadas al ser ensandwichado entre dos polarizadores, éstas aparecen en un espacio a milímetros de distancia fuera del prisma. Sin embargo, cuando esas mismas franjas son observadas usando un prisma de Wollaston, éstas aparece dentro del prisma. La ubicación de las franjas de interferencia, ya sea en el prisma de Nomarski o en el prisma de Wollaston es denominado como *plano de interferencia*. Debido a que el plano de interferencia convencional de un prisma de Wollaston está posicionado en la porción central del prisma, se aproximaría a una línea central entre las dos cuñas (figura 2), esto hace que sea difícil de adaptar un prisma de Wollaston para el uso de objetivos de un microscopio estándar. Este problema surge porque el plano de interferencia del prisma debe coincidir y/o sobreponerse con el plano focal trasero del objetivo, el cual a menudo cae a una distancia muy corta por debajo del montaje sus lentes.

Lo que se hace para resolver este problema es emplear prismas de Nomarski

(que también se conocen como *Wollaston modificado*) tanto para hacer el corte y para la recombinación de los rayos en los planos del condensador y del objetivo, respectivamente. Debido al diseño especializado (que se discute posteriormente) de los prismas de Nomarski, hace que su plano de interferencia se encuentre desplazado por unos cuantos milímetros fuera del prisma, al contrario que en el diseño tradicional de un Wollaston. Los prismas de Nomarski no requieren estar físicamente localizados en el plano focal del objetivo o del condensador, pero pueden estar posicionados a cierta distancia de éstos.

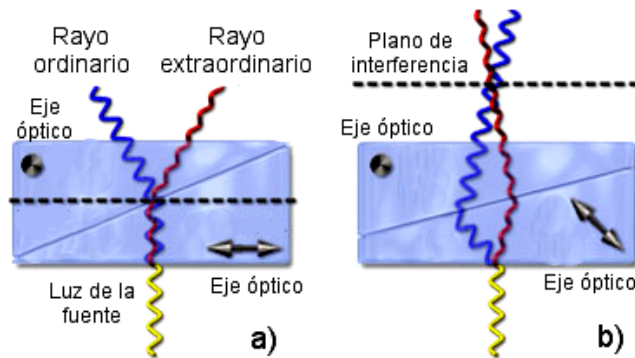


Figura 2: Planos de interferencia en un prisma de a) Wollaston y de b) Nomarski.

El prisma de Nomarski, a diferencia del prisma de Wollaston, consiste en dos cuñas ópticas pegadas una con otra por la hipotenusa. Una de estas cuñas es idéntica a una cuña convencional del Wollaston y tiene sus ejes ópticos paralelos a la superficie del prisma. Sin embargo, la segunda cuña ha sido modificada al ser cortada de tal manera que su eje óptico esté orientado oblicuamente con respecto a la superficie plana del prisma. Cuando las dos cuñas son combinadas para formar un prisma birrefringente, el plano focal (y las franjas de interferencia producidas cuando luz polarizada atraviesa el prisma) cae fuera de la placa del

prisma, como se ilustra en la figura 2. Este efecto ocurre porque ahora el corte toma lugar en la interfase aire-prisma de la cuña inferior, y la diferencia en los índices de refracción en la interfase entre las dos cuñas causa que los frentes de onda cortados converjan en un punto cruzado fuera del prisma. La posición del plano focal del prisma de Nomarski puede ser ajustado en un rango de algunos milímetros al alterar ángulo del eje óptico en la segunda cuña cuando se construye el prisma [27].

En resumen, en los microscopios DIC se pueden encontrar montados un par de prismas de Nomarski, que son los encargados de actuar como los divisores de haz para cortar un frente de onda polarizado, mientras que el prisma objetivo recombina las ondas separadas y regula el grado de separación entre los frentes de onda ordinario y extraordinario. Es importante mencionar que se debe tener un correcto alineamiento en el microscopio, la iluminación de Köhler es un requisito para asegurarse de la posición correcta de los planos de interferencia de ambos prismas de Nomarski con los planos conjugados del condensador y del objetivo. La franja central, o de orden cero, de interferencia es observada cuando los prismas de Nomarski son colocados entre dos polarizadores cruzados, y puede ser usado como referencia para determinar la correcta orientación de los prismas durante el alineamiento del microscopio.

Apéndice B

.3. Códigos de programación

.3.1. Código de Fried

```
function [Dx,Dy] = fried_4(n,sw)
%Fried_4
%Generate Fried inverse derivative matrices
%for n x n pixel region
%Input is the dimension of the region, n and a switch, sw
%sw = 1 for down-interpolation; s = 0 for not.
%Output is the matrices Dx and Dy.
%Dx and Dy are of dimension n^2 X n^2
%09/07/10 D D Duncan
%Further notes:
%Wx, Wy, and A are of dimension n^2 X (n+1)^2
%where A = Wx.^2 is the down-interpolation matrix
%Without this down-interpolation, calculate
%Dx = W_inv*Wx'; Dy = W_inv*Wy'
%The resulting output image will be (n+1) X (n+1)
%minor updates for speed and accuracy 02/03/11
```

```

%
rows = n^2;
cols = (n+1)^2;
%Define fundamental rows of derivative matrices
Rx = zeros(1,cols);
Rx(1) = -0.5; Rx(2) = -0.5; Rx(n+2) = +0.5; Rx(n+3) = +0.5;
Wx = zeros(rows,cols);
Wx(1,:) = Rx;
Ry = zeros(1,cols);
Ry(1) = +0.5; Ry(2) = -0.5; Ry(n+2) = +0.5; Ry(n+3) = -0.5;
Wy = zeros(rows,cols);
Wy(1,:) = Ry;
%Define shift for each successive row
shift = ones(1,rows);
shift(1) = 0;
twos = find(mod([1:rows],n)==1);
shift(twos(2:end)) = 2;
shift = cumsum(shift);
%Place shifted rows in derivative matrices
for row = 2:rows
    Wx(row,:) = circshift(Rx,[1 shift(row)]);
    Wy(row,:) = circshift(Ry,[1 shift(row)]);
end
W = Wx'*Wx + Wy'*Wy;
[U,sig,V] = svd(W);
%extract singular values from sig
singv = diag(sig);
%junk the really small singular values
junk = find(singv < 0.001*mean(singv));

```

```

sig(junk,:) = [];
sig(:,junk) = [];
U(:,junk) = [];
V(:,junk) = [];
%The interpolation matrix, A = Wx.^2
%W_inv = V*inv(sig)*U';
W_inv = V/sig*U'; %more accurate approach than using inv(sig)
if sw == 1
    Dx = Wx.^2*W_inv*Wx';
    Dy = Wx.^2*W_inv*Wy';
else
    Dx = W_inv*Wx'; %numerical values of Dx and Dy are same.
    Dy = W_inv*Wy'; %only the signs are different.
end

```

.3.2. Código del proceso de puntadas

```

%analyze_registered_dat
close all;
clear all;
clc

s=(2.41*.405); %Shear factor
p=200/590; %Conversion pixels-microns
cdtr = pi/180; %Conversion radians-degrees

load phi_R_00

```

```
phi_00_fin = (p*phi_R_00)/s;

load phi_R_90
phi_90_fin = (p*phi_R_90)/s;

clear phi_R_00; clear phi_R_90
%
%prep for phase integration via Fried algorithm
Sx = imrotate(phi_00_fin,0);
Sy = imrotate(phi_90_fin,0);

%%trim to an integer multiple of 32 in each direction
d = size(Sx);
d = d(1);
d = fix(d/32)*32;
Sx = Sx(1:d,1:d);
Sy = Sy(1:d,1:d);

%ensure zero mean slope
%ensure zero mean slope
figure(001); imagesc(Sx); colormap gray; colorbar; axis image

hold on
rectangle('Position',[400 800 299 299]);
hold off

Sa=imcrop(Sx, [400 800 299 299]);

figure(002); imagesc(Sy); colormap gray; colorbar; axis image
```

```
hold on
rectangle('Position',[400 800 299 299]);
hold off

Sb=imcrop(Sy, [400 800 299 299]);

a = mean(Sa(:));
b = mean(Sb(:));
Sx = Sx - a;
Sy = Sy - b;
%
%implement Fried algorithm

figure(4);imagesc(Sx);colormap gray;axis image;colorbar
title('Dx_(radian/pixel)');
xlabel('Píxeles'), ylabel('Píxeles');
line([800 1095],[1100 1100],'LineStyle','-',...
'color','w','Linewidth',6)
text(855, 1050,'100\mum','FontSize',15,'color','w');
hold on
rectangle('Position',[400 800 299 299]);
hold off

figure(5);imagesc(Sy);colormap gray;axis image;colorbar
title('Dy_(radian/pixel)');
xlabel('Píxeles'), ylabel('Píxeles');
line([800 1095],[1100 1100],'LineStyle','-',...
'color','w','Linewidth',6)
```

```

text(855, 1050, '100\mum', 'FontSize', 15, 'color', 'w');
hold on
rectangle('Position',[400 800 299 299]);
hold off

SX=imresize(Sx,200/590);
SY=imresize(Sy,200/590);
figure(41);imagesc(SX);colormap gray;axis image;colorbar
title('Dx_(radian/pixel)');
xlabel('distance_(\mum)'), ylabel('distance_(\mum)');

figure(51);imagesc(SY);colormap gray;axis image;colorbar
title('Dy_(radian/pixel)');
xlabel('distance_(\mum)'), ylabel('distance_(\mum)')

%choose 32 x 32 element reconstruction kernel
n = 32;
[Dx,Dy] = fried_4(n,0);
%perform block-wise reconstruction while estimating
%offset based on overlapping rows and or columns
img_hat = zeros(d+1,d+1);
N = d/n;
%initial top left tile with no overlap
Sx_sub = Sx(1:n,1:n);
Sy_sub = Sy(1:n,1:n);
S_sub = Dx*Sx_sub(:) + Dy*Sy_sub(:);
S_sub = reshape(S_sub,[n+1 n+1]);
overlap_p = S_sub(end,:);
img_hat(1:n+1,1:n+1) = S_sub;

```

```

% figure (6); imagesc(img(1:n,1:n)); colorbar; title('image tile ')
%   figure (7); imagesc(img_hat(1:n,1:n)); colorbar;
%   title('image tile reconstruction ')
%   aa = double(img(1:n,1:n));
%   aa = aa - mean(aa(:));
%   bb = img_hat(1:n,1:n);
%   figure (8); imagesc(aa-bb); axis image; colorbar;
%   title('residual ')

% remainder of column with one overlapped boundary (row)
for row = 2:N
    row_beg = 1+(row-1)*n;
    row_end = row_beg+n-1;
    Sx_sub = Sx(row_beg:row_end,1:n);
    Sy_sub = Sy(row_beg:row_end,1:n);
    S_sub = Dx*Sx_sub(:) + Dy*Sy_sub(:);
    S_sub = reshape(S_sub,[n+1 n+1]);
    overlap_c = S_sub(1,:);

    offset = mean(overlap_p-overlap_c);
    img_hat(row_beg:row_end+1,1:n+1) = S_sub+offset;
    overlap_p = img_hat(row_end+1,1:n+1);
end
for col = 2:N
    col_beg = 1+(col-1)*n;
    col_end = col_beg+n-1;
    overlap_p = img_hat(1:n,col_beg); % single column
    % initial row of columns 2 through end
    % (with one overlapped boundary)

```



```

Sx_sub = Sx(1:n, col_beg:col_end);
Sy_sub = Sy(1:n, col_beg:col_end);
S_sub = Dx*Sx_sub(:) + Dy*Sy_sub(:);
S_sub = reshape(S_sub,[n+1 n+1]);
overlap_c = S_sub(1:end-1,1); %single column
offset = mean(overlap_p-overlap_c);

img_hat(1:n+1,col_beg:col_end+1) = S_sub+offset;
col_overlap = img_hat(n+1:2*n+1,col_beg);
row_overlap = img_hat(n+1,col_beg:col_end+1);
overlap_p = [col_overlap' row_overlap]; %two boundaries
for row = 2:N
    row_beg = 1+(row-1)*n;
    row_end = row_beg+n-1;
    Sx_sub = Sx(row_beg:row_end, col_beg:col_end);
    Sy_sub = Sy(row_beg:row_end, col_beg:col_end);
    S_sub = Dx*Sx_sub(:) + Dy*Sy_sub(:);
    S_sub = reshape(S_sub,[n+1 n+1]);
    col_overlap = S_sub(:,1); %first column
    row_overlap = S_sub(1,:); %first row
    overlap_c = [col_overlap' row_overlap];

    offset = mean(overlap_p-overlap_c);
    img_hat(row_beg:row_end+1,...
        col_beg:col_end+1) = S_sub+offset;
    if row < N;
        col_overlap = img_hat(row_beg+n:row_end+n+1,col_beg);
        row_overlap = img_hat(row_end+1,col_beg:col_end+1);
        overlap_p = [col_overlap' row_overlap];

```

```
        end
    end
end

figure (6); imagesc(img_hat); colormap gray; axis image;
title ('Phase_estimate_(radians)'); colorbar;
xlabel('pixels'), ylabel('pixels');
```


Bibliografía

- [1] C. Preza, S. V. King, and C. J. Cogswell, "Algorithms for extracting true phase from rotationally-diverse and phase-shifted DIC images," Proc. SPIE 6090, 60900E (2006).
- [2] K. J. Dana, "Three dimensional reconstruction of the tectorial membrane: an image processing method using Nomarski differential interference contrast microscopy," Master's thesis (Massachusetts Institute of Technology, 1992).
- [3] Donald D. Duncan, David G. Fischer, Amanda Dayton, and Scott A. Prael, "Quantitative Carré differential interference contrast microscopy to assess phase and amplitude," J. Opt. Soc. Am. A, Vol. 28, No. 6 (2011).
- [4] D. Malacara, "Optical Shop Testing", 3rd ed., Wiley-Interscience, 2007.
- [5] Cheng Y. Y. and J. C. Wyant, "Two-Wavelength Phase Shifting Interferometry," Appl. Opt., 23, 4539–4543 (1984).
- [6] Helen S. S., M. P. Kothiyal, and R. S. Sirohi, "Analysis of Spectrally Resolved White Light Interferograms: Use of a Phase Shifting Technique," Opt. Eng., 40, 1329–1336 (2001).
- [7] Hahn J, Kim H, Cho SW, Lee B. "Phase-shifting interferometry with genetic algorithm-based twin image noise elimination". Appl Opt. 2008 Aug 1;47(22):4068-76.

-
- [8] William N. Sharpe, Jr., William. "Springer Handbook of Experimental Solid Mechanics". Springer. 2008.
- [9] Born M. and E. Wolf, "Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light", 7th ed., University Press, Cambridge, 1999.
- [10] Qingming Luo. "Advantaces in biomedical photonics and imaging". Wuhan, P R China, 4 - 6 November 2007. (pp 199-204).
- [11] M. Shribak and S. Inoué, "Orientation-independent differential interference contrast microscopy," *Appl. Opt.* 45, 460–469 (2006).
- [12] G. Gbur and E. Wolf, "Spreading of partially coherent beams in random media," *J. Opt. Soc. Am. A* 19, 1592–1598 (2002).
- [13] K. Seong, "Optical Metrology for Transmission Interferometric Testing", Master's thesis (University of Arizona, 2008).
- [14] M. Pluta. "Advanced Light Microscopy". Volume 2, Elsevier. PWN - Polish Scientific Publishers, 1989.
- [15] C. B. Müller, K. Weib, W. Richtering, A. Loman, and J. Enderlein, "Calibrating differential interference contrast microscopy with dual-focus fluorescence correlation spectroscopy", *Opt. Express* 16, 4322–4329 (2008).
- [16] S. B. Mehta and C. J. R. Sheppard, "Sample-less calibration of the differential interference contrast microscope," *Appl. Opt.* 49, 2954–2968 (2010).
- [17] D. Murphy, "Differential interference contrast (DIC) microscopy and modulation contrast microscopy," in *Fundamentals of Light Microscopy and Digital Imaging* (Wiley-Liss, 2001), pp. 153–168.

- [18] D. Murphy, J. Hopkins, E. D. Salmon, M. Abramowitz. "Fundamental Concepts in DIC Microscopy". Olympus microscopy resource center. 2012 Olympus America Inc.
- [19] D. Murphy, J. Hopkins, E. D. Salmon, M. Abramowitz. "DIC Microscope Configuration and Alignment". Olympus microscopy resource center. 2012 Olympus America Inc.
- [20] S. V. King, A. Libertun, R. Piestun, C. J. Cogswell, and C. Preza, "Quantitative phase microscopy through differential interference imaging," *J. Biomed. Opt.* 13, 024020 (2008).
- [21] D. L. Fried, "Least-square fitting a wave-front distortion estimate to an array of phase-difference measurements," *JOSA* 67, 370-375 (1977).
- [22] Donald D. Duncan, David G. Fischer, Amanda Dayton, and Scott A. Prael. "Differential interference contrast microscopy for the quantitative assessment of tissue organization"
- [23] D. L. Fried, "Branch point problem in adaptive optics," *J. Opt. Soc. Am. A* 15, 2759– 2768 (1998).
- [24] D. L. Fried, "Adaptive optics wave function reconstruction and phase unwrapping when branch points are present," *Opt. Commun.* 200, 43–72 (2001).
- [25] W. J. Tropf, M. E. Thomas, and T. J. Harris, "Properties of crystals and glasses," in *Handbook of Optics, Volume II: Devices, Measurements, and Properties*, McGraw-Hill, 1995, chap. 33, pp. 33.3 – 33.101, 2nd ed.
- [26] Donald D. Duncan, David G. Fischer, Amanda Dayton, and Scott A. Prael. "Measuring Shear the Mehta Way". November 9, 2010.

- [27] D. Murphy, J. Hopkins, E. D. Salmon, M. Abramowitz. "Wavefront Shear in Wollaston and Nomarski Prisms". Olympus microscopy resource center. 2012 Olympus America Inc.