



INAOE

**“Codificación de la función
de pupila
para extender la
profundidad de campo
usando fuentes
cuasi-puntuales”**

por el

M en I. Omar Palillero Sandoval

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE ÓPTICA**

en el

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

FEBRERO 2015

Tonantzintla, Puebla

J. Félix Aguilar Valdez

©INAOE 2015

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



Agradecimientos.

A Dios, por permitirme alcanzar las metas propuestas y por darme la fuerza suficiente de seguir adelante en todo momento.

Al Dr. Félix Aguilar Valdez, por haber dirigido mi trabajo de tesis; por su paciencia para ayudarme a mejorar mi desempeño como persona, estudiante y profesionalista.

Al Dr. Luis Raúl Berriel Valdós por sus consejos y enseñanzas en el transcurso de este trabajo.

Al Dr. Pablo Loza Alvarez por sus consejos y enseñanzas durante mi estancia en Barcelona.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico mediante la beca 206484. Al INAOE por la oportunidad para prepararme en el mundo de la investigación y al Intituto de Ciencias Fotonicas ICFO por la oportunidad de corroborar los resultados teóricos en el laboratorio SLN.

A mis sinodales los Dres. Esteban Luna Aguilar, Pedro A. Márquez Aguilar, Luis Raúl Berriel Valdós, J. Javier Báez Rojas, J. David Sánchez de la Llave y Arturo Olivares Pérez. Quienes con sus comentarios y observaciones han hecho de éste un mejor trabajo.

A mis padres y mis hermanos, por su amor y su comprensión, por los innumerables sacrificios para apoyarme en esta etapa de mi vida.

A mis compañeros y amigos del INAOE.

Dedicatoria

A mi esposa Mireya Elizabeth y a mi hija Camila Itzayana.

Resumen

Se realizó una codificación del frente de onda para extender la profundidad de campo (DOF por sus siglas en Inglés) en sistemas ópticos formadores de imágenes introduciendo un filtro de fase en la función de pupila. Se proponen tres placas de fase que extienden la profundidad de campo.

Un análisis numérico-experimental del desempeño de las placas de fase que extienden la profundidad de campo se realizó introduciendo una fuente cuasi-puntual. Se usó el criterio de la función de Distribución de Wigner(WDF) para determinar el tamaño del objeto que funge como fuente cuasi-puntual. Este criterio consiste en que la WDF de la imagen detectada debe ser positiva en el ancho de banda del sistema óptico.

El estudio numérico se realizó colocando objetos desenfocados y al utilizar la teoría de formación de imágenes se obtiene una imagen llamada imagen intermedia la cual requiere de un proceso de deconvolución para obtener la imagen final. Este proceso se realizó mediante el uso de un filtro de Wiener.

Una verificación experimental del trabajo numérico se realizó en colaboración con el Instituto de Ciencias Fotónicas ICFO, de Barcelona, España, donde se utilizó una técnica de Microscopia de fluorescencia conocida como hoja de luz (SPIM por sus siglas en Inglés). La codificación de la función de pupila se realizó mediante un espejo deformable y posteriormente, se implementó la etapa de deconvolución digital para restaurar la información de las imágenes capturadas. Finalmente, se presenta en esta tesis una comparación sistemática de los resultados de diferentes máscaras de fase que dan lugar a

una DOF extendida. Se demostró que el uso de la técnica SPIM con codificación de la función de pupila permite una amplia extensión de la DOF para el estudio de muestras biológicas.

Summary

A wavefront coding to extend the depth of field (DOF) in the optical imaging systems was performed by introducing a phase plate in the pupil function. We have proposed three phase plates that extend the depth of field.

A numerical-experimental performance of phase plates that extend the depth of field analysis was performed by introducing a quasi-point source. The criterion of the Wigner distribution function (WDF) was used to determine the size of the object that can be considered as a quasi-point source. This criterion consists essentially of the positivity of the WDF of the image.

The numerical study was performed by placing out of focus objects and using the theory of imaging system, We obtained an image called intermediate image which requires a deconvolution process to obtain the final image. This process is performed using a Wiener filter.

An experimental verification of numerical work was performed in collaboration with the Institute of Photonic Sciences ICFO, located in Barcelona, Spain, where a fluorescence microscopy technique known as light sheet (SPIM for its acronym in English) was used. The wavefront coding was performed using a deformable mirror and then, a digital deconvolution stage was implemented to restore information from the captured images. Finally, this thesis presents a systematic comparison of results from different phase plates to extended DOF. We demonstrated that using the SPIM coding technique pupil function enables broad DOF extension to study biological samples.

Índice general

Resumen	III
Summary	v
1. Introducción	1
2. Teoría de formación de imágenes	4
2.1. Formación de imágenes con iluminación coherente	5
2.1.1. Respuesta al impulso de una lente positiva	8
2.2. Formación de imágenes con iluminación incoherente	12
2.3. Sistema formador de imágenes como sistema lineal.	14
2.3.1. Respuesta en Frecuencia del caso coherente	15
2.3.2. Respuesta en Frecuencia del caso incoherente	16

3. Profundidad de campo y extensión de la profundidad de campo	18
3.1. Antecedentes y nuevas propuestas.	20
3.2. Placa de fase cúbica.	22
3.3. Placa de fase Modificada.	28
3.4. Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.	32
4. Trabajo experimental	43
4.1. Técnica de hoja de Luz	44
4.2. Caracterización.	47
4.3. Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.	49
4.3.1. Modificación de la pupila usando una placa de fase cúbica	52
4.3.2. Modificación de la pupila usando una placa de fase cúbica generalizada	54
4.3.3. Modificación de la pupila usando una placa de fase de la superposición de cuatro polinomios de Zernike	57
4.4. Respuestas en intensidad a la fuente cuasi-puntual en 3D	58
4.5. Codificación de muestras biológicas	61
5. Conclusiones	64

ÍNDICE GENERAL

Bibliografía.	70
---------------	----

Índice de figuras

2.1. La abertura está colocada en un punto P_1 arbitrario al plano de la abertura representada en azul, la propagación de la perturbación viene de izquierda a derecha y el plano de observación esta colocado en un punto arbitrario P_0	5
2.2. Sistemas de coordenadas rectangulares para el tratamiento del problema de difracción.	6
2.3. Geometría de la formación de imágenes.	9
2.4. Sistema formador de imágenes.	11
2.5. MTF de una función de pupila de forma circular.	17
3.1. DOF del sistema óptico.	19
3.2. Error de enfocamiento debido a la posición del objeto.	20
3.3. Modificación de la función de pupila	20

ÍNDICE DE FIGURAS

3.4. Funciones de transferencia en modulación. En a) MTF's de la placa de fase cúbica normalizada en DB tomada de la referencia [1]. En b) MTF's de un sistema óptico estándar libre de aberraciones con un rango de 0 a 2 longitudes de onda tomada de la referencia [2].	21
3.5. IQPSF usando placa de fase cúbica en la pupila.	24
3.6. MTF's asociadas a las QOTF's desenfocadas, el grado de desenfoco es de $0-2\lambda$ y la <i>Ref</i> es el sistema libre de aberraciones. Todas están normalizadas y se muestra solo una sección que esta muy cerca de la frecuencia de corte.	25
3.7. Objetos a distintas posiciones, codificados usando placa de fase cúbica.	25
3.8. Imágenes intermedia y restaurada.	27
3.9. Imágenes restaurada, se realiza un acercamiento de la parte central de ambas imágenes restaurada.	27
3.10. IQPSF usando placa de fase modificada con pupila circular.	29
3.11. MTF's asociadas a las QOTF's desenfocadas, el grado de desenfoco es de $0-2\lambda$ y la <i>Ref</i> es el sistema libre de aberraciones. Todas están normalizadas y se muestra solo una sección que esta muy cerca de la frecuencia de corte.	29
3.12. Objetos a distintas posiciones, codificados usando placa de fase Modificada.	30
3.13. Imágenes intermedia y restaurada.	30
3.14. Imágenes restaurada y zoom de la parte central de la imagen restaurada.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

3.15. Forma de la superficie de la placa de fase usando la ecuación 3.10. a) gráfica en 3-D. b) mapa de contornos.	33
3.16. Diferencia al Cuadrado para seleccionar el valor de α	35
3.17. Respuestas a la fuente puntual y fuente cuasi-puntual. En (a) y (b) las IPSF's, en (c) y (d) las IQPSF's; (a) y (c) sin filtro apodizador, en (b) y (d) con filtro apodizador.	36
3.18. MTF's asociadas a las QOTF's desenfocadas, el grado de desenfoco es de $0-2\lambda$ y la <i>Ref</i> es el sistema libre de aberraciones. Todas están normalizadas y se muestra solo una sección que esta muy cerca de la frecuencia de corte.	37
3.19. MTF's asociadas a las QOTF's desenfocadas usando filtro apodizante en la pupila, el grado de desenfoco es de $0 - 2\lambda$ y la <i>Ref</i> es el sistema libre de aberraciones. Todas están normalizadas y se muestra solo una sección que esta muy cerca de la frecuencia de corte.	37
3.20. Experimento numérico de cuatro objetos colocados fuera de eje y desenfocados.	38
3.21. Imagen de los cuatro objetos capturados simultáneamente, con diferentes cantidades de desenfoco y usando un sistema óptico sin placa de fase.	39
3.22. Imágenes obtenidas con la placa propuesta. En (a) y (b) las imágenes intermedias, en (a) sin apodizador, y (b) usando apodizador; (c) y (d) son las imágenes restauradas de (a) y (b) respectivamente.	40
3.23. Imágenes obtenidas con una placa de fase cúbica de pupila circular. En (a) y (b) las imágenes intermedias, en (a) sin apodizador, y (b) usando apodizador; (c) y (d) son las imágenes restauradas de (a) y (b) respectivamente.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

3.24. Comparación de las imágenes restauradas. En (a) la imagen restaurada usando un sistema óptico con una placa de fase cúbica de pupila circular, (b) imagen restaurada usando la placa de fase propuesta.	42
4.1. Principio básico del SPIM.	45
4.2. Características de la hoja de luz.	45
4.3. Arreglo óptico de LSFM.	46
4.4. Algunas mediciones de la abertura NA y del ancho de la hoja. En $a)$ se muestra la medición de la NA con una línea de barrido en x . En $b)$ el ancho del campo de visión, la línea de barrido en x es el ancho del campo de visión y la línea de barrido en y es el espesor de la hoja de luz.	47
4.5. Campo de visión de la hoja de luz. La línea roja corresponde a los valores medidos experimentalmente y la línea azul al ajuste numérico.	48
4.6. Espesor de la hoja de luz. La línea roja corresponde a los valores medidos experimentalmente y la línea azul al ajuste numérico.	49
4.7. Arreglo óptico del SPIM usando elementos de óptica adaptiva, para corregir las aberraciones del sistema y codificar otros frentes de onda.	50
4.8. Aspecto de la pantalla del software Shack-Hartmann de la medición del frente de onda de una microesfera sin corregir el sistema óptico.	51
4.9. Frente de onda corregida después de un lazo cerrado.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

- 4.10. IQPSF's usando placa de fase cúbica con dos valores de α . En a) Una IQPSF con $\alpha = 10\mu m$. En b) una IQPSF con $\alpha = 20\mu m$. 53
- 4.11. IQPSF's usando placa de fase cúbica generalizada con dos parámetros de α . En a) Una IQPSF con $\alpha = 10\mu m$. En b) una IQPSF con $\alpha = 20\mu m$ 57
- 4.12. IQPSF's usando placa de fase de la superposición de 4 polinomios de Zernike con dos parámetros de α . En a) Una IQPSF con $\alpha = 10\mu m$. En b) una IQPSF con $\alpha = 20\mu m$ 58
- 4.13. Esquema del experimento para encontrar las IQPSF's en 3D. En a) se muestra un esquema en 1D de las posiciones en las que se va ir moviendo el objeto y en b) un ejemplo de las imágenes que se van obteniendo y se van apilando para formar una imagen en 3D. 59
- 4.14. IQPSF's en 3D, la barra de escala es de $50\mu m$. En (a,i) se muestra la IQPSF libre de aberraciones, en (b,i) se muestra la correspondiente IQPSF en 3D; en (a,ii) la IQPSF usando la placa de fase cúbica, en (b,ii) la correspondiente IQPSF en 3D; en (a,iii) la IQPSF usando la placa de fase cúbica generalizada, en (b,iii) la correspondiente IQPSF en 3D; en (a,iv) la IQPSF usando la placa de fase propuesta en esta tesis, en (b,iv) la correspondiente IQPSF en 3D;. 60

4.15. IQPSF's en 3D, en (a,i) muestra el mapa de contornos en para cuando se usa la placa de fase cúbica con un $\alpha = 10\mu m$, en (a,ii) el mapa de contornos cuando se usa la placa de fase cúbica para un $\alpha = 20\mu m$; (b,i) muestra el mapa de contornos en para cuando se usa la placa de fase cúbica generalizada con un $\alpha = 10\mu m$, en (b,ii) el mapa de contornos cuando se usa la placa de fase cúbica generalizada para un $\alpha = 20\mu m$; (c,i) muestra el mapa de contornos en para cuando se usa la placa de fase propuesta con un $\alpha = 10\mu m$, en (c,ii) el mapa de contornos cuando se usa la placa de fase propuesta para un $\alpha = 20\mu m$;	61
4.16. Restauración de muestras biológicas. a) y b) Faringe de <i>C. Elegans</i> . c) Larva de mosca y d) Embrión de mosca. Las codificaciones son: i) Cúbica pupila circular, ii) Cúbica generalizada, iii) Superposición de cuatro polinomios de Zernike y iv) sistema libre de aberraciones.	62

Índice de Tablas

3.1. Posición de los objetos en el sistema óptico.	38
--	----

Capítulo 1

Introducción

El problema de extender la profundidad de campo (o de foco) en los sistemas ópticos formadores de imágenes (OS por sus siglas en Inglés) ha atraído la atención de muchos investigadores desde hace varios años [3, 4]. Así es en múltiples aplicaciones que van desde la astronomía a la fotografía tanto científica como artística, pasando por la microscopía en sus distintos campos de aplicación [5, 6].

El motivo radica principalmente, en que al adquirir una imagen de alguna escena o algún objeto extendido solamente aparecen de forma definida y clara aquellos elementos que están colocados en el llamado plano objeto del sistema. En algunos casos, esto puede representar una ventaja, sin embargo en otros casos es deseable que todos los elementos en el campo de visión aparecieran bien definidos en la imagen.

De la teoría de formación de imágenes se sabe que todo sistema formador de imágenes tiene la propiedad llamada *profundidad de campo*, que es una cierta tolerancia al desenfocamiento [2, 7], esta se mide en unidades de longitud y es aquella distancia medida en el eje óptico a partir de la posición del plano objeto, dentro de la cual es posible colocar un objeto sin que su imagen

correspondiente sea degradada significativamente [8]. Desafortunadamente, la profundidad de campo va en razón inversa del cuadrado de la abertura numérica del sistema, y como es sabido, la resolución del sistema está en razón directa de la abertura numérica. Esto significa que a mayor resolución menor profundidad de campo. En algunas ocasiones se decide sacrificar la resolución del sistema para ganar un poco de profundidad de campo, esto ocurre frecuentemente en la fotografía artística, por ejemplo [9, 10, 11, 12]

En la década de los años noventa del siglo pasado aparecieron una serie de trabajos en los cuales se proponía un método para extender la profundidad de campo a partir de modificar la fase en la función de pupila del sistema. Dicha propuesta implicaba una segunda etapa en el proceso de formación de imágenes. Este segundo paso es una restauración digital, típicamente una deconvolución. Esta técnica se conoce como el método de codificación del frente de onda [1]. Más tarde se verificó de manera experimental este resultado teórico [13].

En los años subsecuentes fueron apareciendo nuevas propuestas en la misma línea razonamiento para extender la profundidad de campo mediante la modificación de la pupila, pero algunas de las propuestas resultaron de enorme dificultad para su realización experimental [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. En años recientes, sin embargo, el desarrollo de algunos dispositivos ópticos como los moduladores espaciales de luz (SLM por sus siglas en Inglés) o como los espejos deformables abrieron la posibilidad de introducir funciones de fase complejas que en otras circunstancias representaban desafíos de gran dificultad. Es en este marco es donde se encuadra el trabajo de esta tesis, es decir, en la propuesta de modificar (o codificar) la función de pupila de un sistema formador de imágenes para extender la profundidad de campo y su correspondiente realización experimental.

Podemos entonces plantear el siguiente.

Objetivo de esta tesis: Proponer diferentes codificación de la función de pupila de un sistema formador de imágenes para extender la profundidad de campo. Probando su efectividad en forma numérica y experimental.

Así es como en el siguiente capítulo se presentan los fundamentos de la

Introducción

teoría de formación de imágenes a partir de la teoría escalar de difracción, terminando con las ecuaciones de formación de imágenes que surgen de la aplicación de la teoría de sistemas lineales para los casos de iluminación coherente e iluminación incoherente. En el tercer capítulo se presentan las codificaciones de la función de pupila propuestas en la tesis y se comparan con las primeras codificaciones propuestas, ahí mismo se muestran resultados numéricos. Aquí se hace uso del concepto de fuente cuasi-puntual para caracterizar un sistema formador de imágenes en forma experimental. En el capítulo cuatro se presenta en forma detallada el trabajo experimental que se realizó con objeto de verificar la eficiencia de las placas codificadas propuestas. Por último, en el capítulo cinco se hacen las conclusiones y comentarios finales de la tesis.

Capítulo 2

Teoría de formación de imágenes

El objetivo de este capítulo es introducir los conceptos básicos para modelar el proceso de formación de imágenes. El tipo de iluminación, el tamaño y la forma de la función de pupila son solo algunas características que determinan el sistema óptico. En algunos casos es importante que un sistema formador de imágenes permita un amplio rango de profundidad focal, es decir, que la imagen tenga la suficiente calidad óptica en un rango axial amplio en la vecindad de la posición del plano de observación, este problema es debido a que no siempre es posible colocar el plano de la imagen en el plano conjugado del objeto.

Por otro lado, la teoría de sistemas lineales es una herramienta útil para describir el proceso de formación de imágenes, y permite representar al sistema óptico mediante una función característica que lo define. Usualmente esta se obtiene cuando se forma la imagen de un punto luminoso y se le conoce como función de punto extendido, es lo que en la teoría de sistemas lineales se le conoce como respuesta al impulso unitario. A continuación se presentan los dos tratamientos típicos en la teoría de formación de imágenes que son

2.1 Formación de imágenes con iluminación coherente

uno iluminación coherente y dos la formación de imágenes con iluminación incoherente, haciendo uso de la teoría sistemas lineales.

2.1. Formación de imágenes con iluminación coherente

La formación de imágenes tiene como punto de partida la teoría escalar de la difracción. La perturbación óptica cuando pasa a través de una abertura finita produce una distribución en el llamado plano de observación, cuando la perturbación es de tipo coherente el tratamiento es en amplitud compleja. La iluminación coherente se debe a las contribuciones de cada punto luminoso de un frente de onda y que además cada uno de los puntos luminosos presenta la misma fase [22]. La siguiente figura representa el paso de la perturbación a través de una abertura.

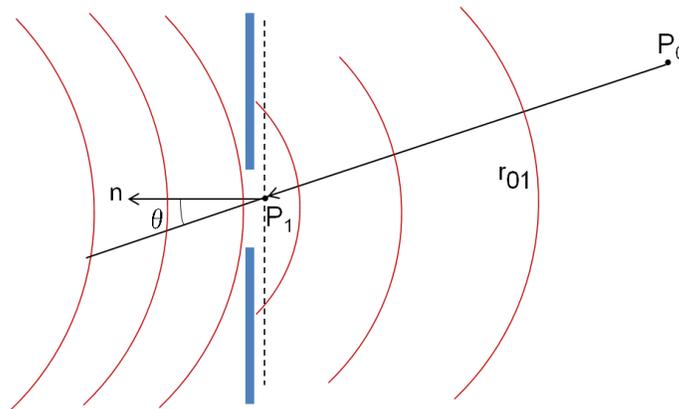


Figura 2.1: La abertura está colocada en un punto P_1 arbitrario al plano de la abertura representada en azul, la propagación de la perturbación viene de izquierda a derecha y el plano de observación esta colocado en un punto arbitrario P_0 .

Bajo la consideración de usar una iluminación coherente escalar, *Huygens – Fresnel* proponen una superposición de ondas esféricas al atravesar esta

2.1 Formación de imágenes con iluminación coherente

abertura y esta formulación da como resultado la siguiente ecuación [23]:

$$U(P_0) = \frac{1}{i\lambda} \iint U(P_1) \frac{e^{(ikr_{01})}}{r_{01}} \cos\theta ds, \quad (2.1)$$

donde $U(P_0)$ es el campo en el punto P_0 producido por la perturbación proveniente de la abertura, P_1 es un punto arbitrario en el plano de la abertura, i es la raíz cuadrada de -1 , λ es la longitud de onda, r_{01} es la distancia desde el punto P_0 al punto P_1 , θ es el ángulo que se forma entre el vector de la normal y el de la distancia r_{01} y $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ que corresponde al número de onda, ver figura 2.1.

Sin embargo, al expresar el $\cos\theta = \frac{z}{r_{01}}$ y además ejemplificando la figura 2.1 usando un nuevo esquema como el de la siguiente figura, se puede reescribir la ecuación 2.1 usando el caso de coordenadas rectangulares.

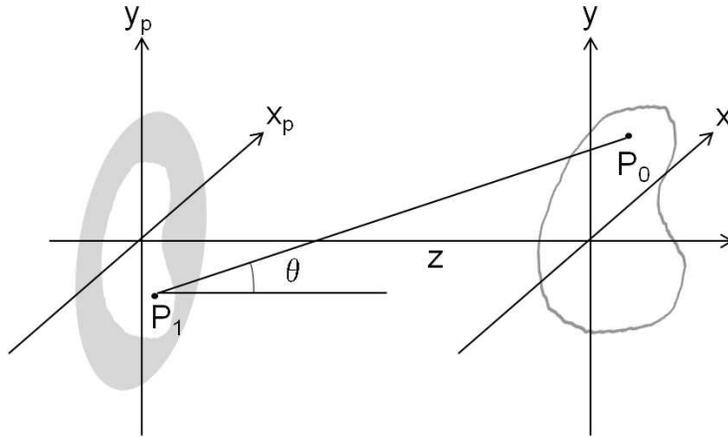


Figura 2.2: Sistemas de coordenadas rectangulares para el tratamiento del problema de difracción.

Como se muestra en la figura 2.2, la abertura de difracción se supone en el plano (x_p, y_p) y el plano (x, y) contiene el punto de observación P_0 por lo que

2.1 Formación de imágenes con iluminación coherente

el campo difractado se expresa de la siguiente manera

$$U(x, y) = \frac{z}{i\lambda} \int \int U(x_p, y_p) \frac{e^{(ikr_{01})}}{r_{01}^2} dx_p dy_p, \quad (2.2)$$

donde $r_{01} = \sqrt{z + (x - x_p)^2 + (y - y_p)^2}$ para la figura 2.2, utilizando una expansión binomial, r_{01} queda expresada de la siguiente manera,

$$r_{01} \approx z \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{(x - x_p)}{z} \right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{(y - y_p)}{z} \right)^2 \right]. \quad (2.3)$$

Al utilizar la expansión dada por la ecuación 2.3 se puede realizar una aproximación conocida como aproximación paraxial, obteniendo la siguiente ecuación [23],

$$U(x, y) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{i\frac{k}{2z}(x^2+y^2)} \int \int U(x_p, y_p) e^{i\frac{k}{2z}(x_p^2+y_p^2)} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}(x_p x + y_p y)} dx_p dy_p, \quad (2.4)$$

a la ecuación 2.4 se le conoce aproximación de *Fresnel* ó difracción de campo cercano, y se observa que se puede calcular realizando la transformada de Fourier del producto de la amplitud compleja en la abertura con un factor de fase cuadrático.

2.1 Formación de imágenes con iluminación coherente

Existe otra aproximación que se puede realizar a partir de la difracción de Fresnel. Si z es más grande que el factor de fase cuadrático, es decir, si $z \gg \frac{k(x_p^2 + y_p^2)}{2}$, este término cuadrático se puede aproximar a la unidad y por lo tanto la perturbación en el punto de observación queda expresada de la siguiente forma,

$$U(x, y) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{i\frac{k}{2z}(x^2 + y^2)} \iint U(x_p, y_p) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}(x_p x + y_p y)} dx_p dy_p, \quad (2.5)$$

la aproximación dada por la ecuación 2.5 es conocida como difracción de Fraunhofer ó de campo lejano y puede también escribir de la siguiente manera,

$$U(x, y) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{i\frac{k}{2z}(x^2 + y^2)} \iint U(u, v) e^{-i2\pi(ux + vy)} du dv, \quad (2.6)$$

donde hemos introducido las siguientes variables, u y v , que se conocen como las frecuencias espaciales y se definen de la siguiente forma, $u = \frac{x_p}{\lambda z}$ y $v = \frac{y_p}{\lambda z}$. Se observa que la difracción de Fraunhofer coincide con la transformada de Fourier de la amplitud compleja en el plano de la abertura.

2.1.1. Respuesta al impulso de una lente positiva

Debido a la intención de formar imágenes con un sistema formador de imágenes es importante mencionar el caso mas general para cuando se hace uso de una lente. Se propone el esquema del arreglo de la figura 2.3 donde se puede observar que está colocada una abertura a una distancia z_1 con una transmitancia de $At_a(x, y)$, donde A es la amplitud de la perturbación y $t_a(x, y)$ es la transmitancia de la perturbación en amplitud compleja; una

2.1 Formación de imágenes con iluminación coherente

lente delgada está colocada entre las distancias z_1 y z_2 y finalmente el plano de observación está colocado a una distancia z_2 .

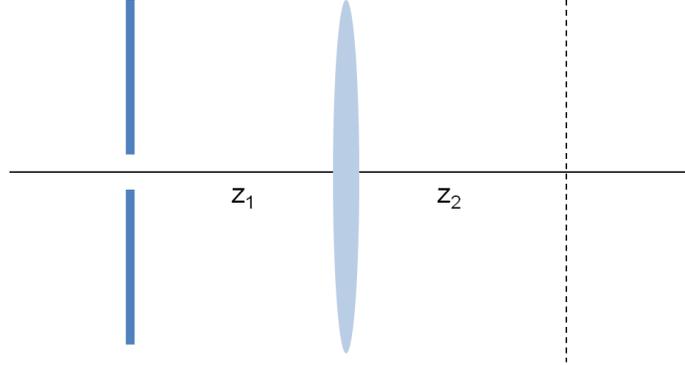


Figura 2.3: Geometría de la formación de imágenes.

La lente tiene una distancia focal f con un tamaño finito que está asociada con una función de pupila $P(x_p, y_p)$, la transmitancia de la lente, t_l , se expresa por la siguiente ecuación [23],

$$t_l(x, y) = P(x, y)e^{-i\frac{k}{2f}(x^2+y^2)}, \quad (2.7)$$

Se asume que la aproximación de Fresnel es válida para la propagación de la abertura a la distancia z_1 , también la propagación desde la lente al plano de observación en la distancia z_2 y además tomando en cuenta la transmitancia de la lente con su distancia focal f . Entonces la relación de estas distancias contiene todos estos factores cuadráticos de fase y se expresa por la siguiente expresión,

$$e\left[i\frac{k}{2}\left(\frac{1}{z_1} + \frac{1}{z_2} - \frac{1}{f}\right)(x^2+y^2)\right]. \quad (2.8)$$

Se puede notar de la expresión anterior que el argumento de la fase tiene una expresión donde se relacionan las distancias de la siguiente manera,

$$\frac{1}{z_1} + \frac{1}{z_2} - \frac{1}{f} = 0, \quad (2.9)$$

2.1 Formación de imágenes con iluminación coherente

Esta relación es conocida como la ecuación de lentes delgadas, si se cumple esta expresión entonces queda una transformada de Fourier exacta.

Si se toma en cuenta la linealidad del fenómeno de propagación de ondas, se puede tomar en cuenta una integral de superposición de la siguiente forma,

$$U_i(x, y) = \int \int \tilde{h}(x, y; x_o, y_o) U(x_o, y_o) dx_o dy_o, \quad (2.10)$$

donde $\tilde{h}(x, y; x_o, y_o)$ es el campo en amplitud compleja en coordenadas (x, y) producido por un punto luminoso en coordenadas del objeto (x_o, y_o) , $U_i(x, y)$ es la distribución compleja en el plano de la imagen. La respuesta por el punto luminoso queda expresado de la siguiente manera

$$\tilde{h}(x, y; x_o, y_o) = \frac{1}{\lambda^2 z_1 z_2} \int \int P(x_p, y_p) e^{-i \left[\frac{2\pi}{\lambda z_2} (x - M x_o) x_p + (y - M y_o) y_p \right]} dx_p dy_p, \quad (2.11)$$

donde $M = -\frac{z_2}{z_1}$ y se le conoce amplificación, por lo tanto si la ley de las lentes delgadas se cumple, la respuesta al punto luminoso esta dada por la difracción de aproximación de Fraunhofer de la abertura de la lente, centrada sobre las coordenadas de la imagen $(u = M x_o, v = M y_o)$.

Tomando en cuenta el caso general de una lente, se representa un sistema óptico formador de imágenes es mediante el esquema de la figura 2.4, en donde se observa que está conformado por dos planos, el plano del objeto el cual esta localizado a una distancia z_o de la pupila de entrada al sistema óptico y el plano de la imagen a una distancia z_i a la pupila de salida del

2.1 Formación de imágenes con iluminación coherente

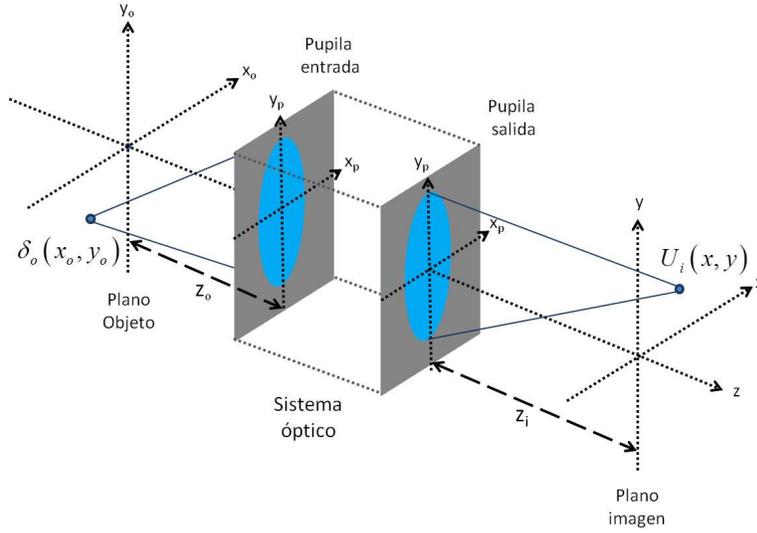


Figura 2.4: Sistema formador de imágenes.

sistema óptico; el sistema óptico puede contener muchos elementos ópticos pero siempre contiene una pupila de entrada y una pupila de salida y es posible hacer esta simplificación dado que una es imagen de la otra.

En términos de la teoría de sistemas lineales el plano del objeto puede ser identificado como el plano de entrada y el plano de la imagen como el plano de la salida. Suponiendo entonces válido el principio de superposición se puede escribir una expresión que defina el proceso de formación de imágenes en términos de un estímulo puntual lo cual en este caso correspondería con un objeto que consiste de un punto luminoso y se expresaría de la siguiente manera,

$$g_a(x, y) = \int \int \tilde{h}(x - x_o, y - y_o) \delta(x_o, y_o) dx_o dy_o, \quad (2.12)$$

donde $g_a(x, y)$ es la salida del sistema óptico en amplitud compleja, $\tilde{h}(x - x_o, y - y_o)$ es la función característica del sistema óptico y $\delta(x_o, y_o)$ es el estímulo producido por un punto luminoso en el plano del objeto. Por lo tanto la salida se le conoce a la llamada función de punto extendido en

2.2 Formación de imágenes con iluminación incoherente

amplitud, (*apsf* por sus siglas en inglés). Entonces, tomando en cuenta la ecuación 2.11 la *psf* corresponde a la transformada de Fourier de la función de pupila $P(x_p, y_p)$ y se expresa por la siguiente ecuación,

$$\tilde{h}(x, y) = \int \int P(u, v) e^{-i2\pi(ux+vy)} dudv \quad (2.13)$$

donde $u = \frac{x_p}{\lambda z_i}$ y $v = \frac{y_p}{\lambda z_i}$ son las variables espaciales y están en términos de las coordenadas del plano de la pupila. Si ahora el objeto es representado por una distribución de amplitud compleja $o_a(x_o, y_o)$, la imagen correspondiente a partir de la ecuación 2.12 queda de la siguiente manera,

$$g_a(x, y) = \int \int \tilde{h}(x - x_o, y - y_o) o_a(x_o, y_o) dx_o dy_o, \quad (2.14)$$

se observa que la ecuación 2.14 es una integral de convolución, de ahí se puede concluir que los sistemas ópticos formadores de imágenes con iluminación coherente son lineales en amplitud compleja. Hasta aquí se ha tratado el caso de iluminación coherente, a continuación se estudiará el caso para iluminación incoherente.

2.2. Formación de imágenes con iluminación incoherente

En la sección anterior se presentó una formulación para el proceso de formación de imágenes usando luz coherente, en cambio cuando se usa iluminación incoherente el tratamiento es distinto. En este caso la iluminación

2.2 Formación de imágenes con iluminación incoherente

presenta una fase aleatoria, es decir, la naturaleza de este tipo de luz es estadística y existe una dependencia tanto del tiempo como del espacio, así que es necesario realizar un promedio temporal con lo cual la ecuación de formación de imágenes queda de la siguiente manera,

$$g_i(x, y) = \langle |\int \int \tilde{h}(x - x_o, y - y_o) o_a(x_o, y_o; t) dx_o dy_o|^2 \rangle, \quad (2.15)$$

donde $g_i(x, y)$ es la salida del sistema óptico en intensidad, sin embargo al tomar módulo cuadrado de $g_i(x, y)$ queda la siguiente expresión,

$$\begin{aligned} g_i(x, y) &= \int \int dx_o dy_o \int \int dx_o dy_o \tilde{h}(x - x_o, y - y_o) \tilde{h}^*(x - x_o, y - y_o) \\ &\times \langle o_a(x_o, y_o; t) o_a^*(x_o, y_o; t) \rangle, \end{aligned} \quad (2.16)$$

donde $o_i(x_o, y_o) = \langle o_a(x_o, y_o; t) o_a^*(x_o, y_o; t) \rangle$ y $h(x - x_o, y - y_o) = \tilde{h}(x - x_o, y - y_o) \tilde{h}^*(x - x_o, y - y_o)$ utilizando la teoría de coherencia, por lo que la ecuación de formación de imágenes en este caso resulta [23]

$$g_i(x, y) = \int \int h(x - x_o, y - y_o) o_i(x_o, y_o) dx_o dy_o. \quad (2.17)$$

donde $g_i(x, y)$ es la salida del sistema óptico en intensidad, o_i es la transmitancia en intensidad del objeto y $h(x, y)$ es conocida como función de punto

2.3 Sistema formador de imágenes como sistema lineal.

extendido en intensidad *ipsf*, por sus siglas en Inglés. La ecuación anterior es también una integral de convolución con lo cual se concluye que un sistema óptico formador de imágenes con iluminación incoherente es lineal en intensidad.

2.3. Sistema formador de imágenes como sistema lineal.

Se usarán las ventajas de la teoría sistemas lineales para el tratamiento de sistemas formadores de imágenes. La ecuación 2.14 se expresa de manera muy simple de la siguiente forma

$$g_a(x, y) = \tilde{h}(x, y) \star o_a(x, y), \quad (2.18)$$

donde $g_a(x, y)$ es la distribución de amplitud compleja en el plano de salida, $o_a(x, y)$ es la transmitancia del objeto en amplitud compleja, $\tilde{h}(x, y)$ es la *psf* y $[\star]$ significa operación de convolución.

Por otro lado, en el caso de iluminación incoherente se puede escribir la ecuación 2.15 de la siguiente manera,

$$g_i(x, y) = h(x, y) \star o_i(x, y), \quad (2.19)$$

donde $g_i(x, y)$ es la distribución en intensidad en el plano de salida, $h(x, y)$ es la función de punto extendido en intensidad, $o_i(x_o, y_o)$ es la transmitancia del objeto en intensidad y $[\star]$ indica convolución.

2.3.1. Respuesta en Frecuencia del caso coherente

Cuando se realiza un tratamiento usando la transformada de *Fourier* se dice que el tratamiento es en el espacio de Fourier o espacio de frecuencia. Al observar que la integral de la ecuación 2.14 es una integral de convolución y hacer un análisis en el espacio de las frecuencias se tiene como resultado una simple multiplicación de los espectros y así definimos la *función de transferencia en amplitud* (ATF, por sus siglas en Inglés) la cual es la transformada de *Fourier* de la *psf*, y se escribe de la siguiente forma

$$H(u, v) = F\{\tilde{h}(x, y)\}, \quad (2.20)$$

donde $H(u, v)$ se le conoce como *Función de Transferencia Coherente*, y u y v son las variables en el espacio de las frecuencias antes mencionadas.

Es necesario reconocer que las distribuciones de amplitud compleja del objeto y de la imagen se les puede expresar en el dominio de las frecuencias, es decir, encontrar el espectro de la ecuación 2.18 quedando como sigue,

$$G_a(u, v) = H(u, v) O_a(u, v), \quad (2.21)$$

donde $O_a(u, v)$ corresponde al espectro del objeto, $G_a(u, v)$ es el espectro de la imagen. Para el caso de una abertura circular con función de pupila $P(x, y)$ como la siguiente expresión,

$$P(x_p, y_p) = \text{circ} \left(\sqrt{\frac{x_p^2 + y_p^2}{r}} \right) \quad (2.22)$$

donde r es el radio de la abertura circular y x, y corresponden a las coordenadas espaciales. Entonces, la función de transferencia se puede escribir de

2.3 Sistema formador de imágenes como sistema lineal.

la siguiente forma,

$$H(u, v) = \text{circ} \left(\sqrt{\frac{u^2 + v^2}{\rho_c}} \right) \quad (2.23)$$

donde (u, v) corresponde a las frecuencias espaciales donde $u = \frac{x_p}{\lambda z_i}$ y $v = \frac{y_p}{\lambda z_i}$, $\rho_c = \frac{r}{\lambda z_i}$ es la frecuencia de corte del sistema, λ la longitud de onda y z la distancia al plano imagen. Con este ejemplo se concluye el estudio en frecuencias de sistemas formadores de imágenes en iluminación coherente y a continuación se describe el caso de iluminación incoherente.

2.3.2. Respuesta en Frecuencia del caso incoherente

Para representar el caso incoherente en el espacio de frecuencias, es realizar la transformada Fourier de la ecuación 2.19, con lo que se obtiene

$$G_i(u, v) = OTF(u, v) O_i(u, v), \quad (2.24)$$

donde $O_i(u, v)$ corresponde al espectro de la distribución de intensidad del objeto, $G_i(u, v)$ es el espectro de la imagen y la transformada de Fourier de $h(x, y)$ se le conoce como función de transferencia óptica (OTF, por sus siglas en Inglés). Al módulo de la función de transferencia óptica, $|OTF(u, v)|$, se le conoce como la *Función de Transferencia en Modulaci3n*, (MTF por sus siglas en inglés). Particularmente se puede verificar que la función de transferencia óptica de la siguiente manera,

$$OTF(u, v) = H(u, v)H^*(u, v), \quad (2.25)$$

donde $OTF(u, v)$ es la transformada de Fourier de $\tilde{h}(x, y)$ por la transformada de Fourier de su complejo conjugado. Para el caso de una abertura

2.3 Sistema formador de imágenes como sistema lineal.

circular con función de pupila $P(x, y)$ como la ecuación 2.22, la función de transferencia óptica queda de la siguiente forma,

$$OTF(u, v) = \frac{\int \int P(x_p + \lambda z_i u, y_p + \lambda z_i v) P(x_p - \lambda z_i u, y_p - \lambda z_i v) dx_p dy_p}{\int \int P(x_p, y_p) dx_p dy_p} \quad (2.26)$$

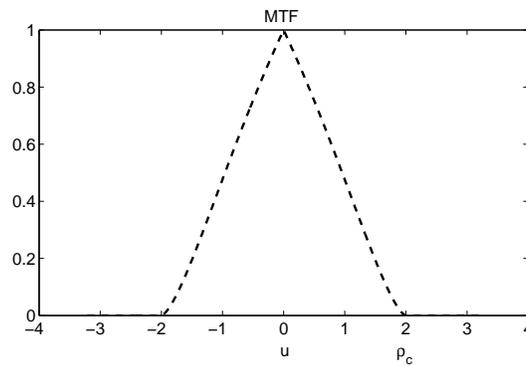


Figura 2.5: MTF de una función de pupila de forma circular.

En la figura anterior se muestra la MTF de una función de pupila circular, se muestra que la frecuencia de corte esta normalizada y también que es el doble de la frecuencia de corte coherente. Con este ejemplo se concluye el estudio en frecuencias de sistemas formadores de imágenes en iluminación incoherente y a continuación comienza el estudio central de este trabajo.

Capítulo 3

Profundidad de campo y extensión de la profundidad de campo

En el capítulo anterior se mostró que el proceso de formación de imágenes puede ser descrito utilizando la teoría de sistemas lineales. Las funciones de transferencia para los casos de iluminación coherente e incoherente describen al sistema óptico formador de imágenes y estas funciones de transferencia contienen toda la información del mismo, como pueden ser la presencia de aberraciones.

Y ahora en este capítulo prestamos atención en el tema central de esta tesis, que es la extensión de la profundida de campo. La profundidad de campo (*DOF*, por sus siglas en inglés) de un sistema formador de imágenes se entiende como la distancia medida sobre el eje óptico a partir del plano del objeto donde las imágenes correspondientes tienen buen contraste y pueden ser consideradas en foco, se conviene que la *DOF* está dada por la siguiente expresión, $\delta z_0 = \mp[\lambda/2(NA)^2M^2]$. Ver figura 3.1.

Donde *NA* es la abertura numérica y *M* es la amplificación.

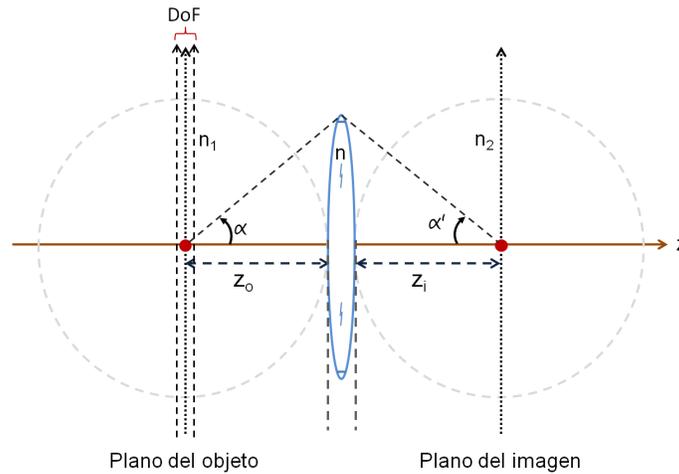


Figura 3.1: DOF del sistema óptico.

Por otro lado, la distancia medida sobre el eje óptico a partir del plano de la imagen dentro del cual las imágenes tienen buen contraste se le conoce como profundidad de foco y está dada por la siguiente expresión, $\delta z_i \approx \mp[\lambda/2(NA)^2]$ [8, 24].

Un problema que se ha estudiado por años es la manera de extender la profundidad de campo, con el objetivo de tener en una sola imagen con gran nitidez de los objetos que están en el campo de visión y una forma de resolver este problema es la modificación de la función pupila [3, 4].

Con esta técnica es posible modificar el frente de onda de tal forma que se puede inhibir el desenfoque. En general, si un punto luminoso fuese colocado en el plano del objeto a una distancia z_o y este generará frentes de onda completamente esféricos, se considera idealmente libre de aberraciones, es decir, que no existe ningún parámetro que pueda distorsionar a la onda esférica, por lo que se puede representar con una esfera de referencia, tal como se observa en la figura 3.2.

Los objetos colocados en estas posiciones se consideran desenfocados en el plano de la imagen, ver figura 3.2; H. H. Hopkins estableció que la diferencia de la esfera de referencia con la esfera correspondiente al frente de onda de los objetos colocados adelante ó atrás, se conoce como diferencia angular y se expresa por $W_{2,0}$, este coeficiente pertenece al polinomio de aberración

3.1 Antecedentes y nuevas propuestas.

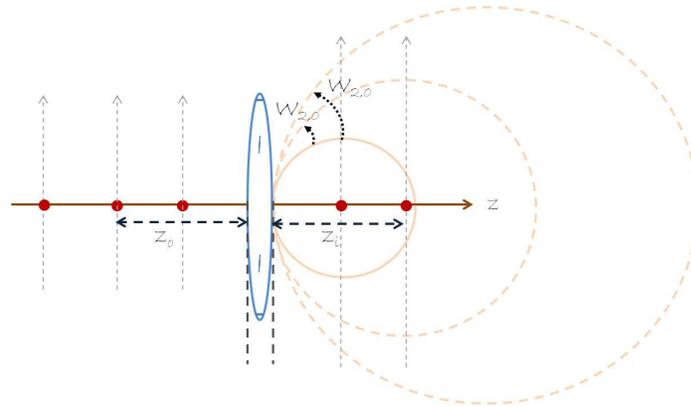


Figura 3.2: Error de enfocamiento debido a la posición del objeto.

que define al desenfoque [2, 25]. A continuación se presenta un estudio de un conjunto de máscaras de fase que al incluirlas en la pupila extienden la profundidad de campo.

3.1. Antecedentes y nuevas propuestas.

El uso de filtros colocados en la pupila para extender el DOF es conocido como el método de codificación de la función de pupila. Los filtros pueden ser de sombra o de fase [1, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 26, 27]. Particularmente se estudiarán filtros de fase o placas de fase para lograr extender la profundidad de campo y un esquema general de como colocar el filtro es el que se muestra en la figura 3.3,

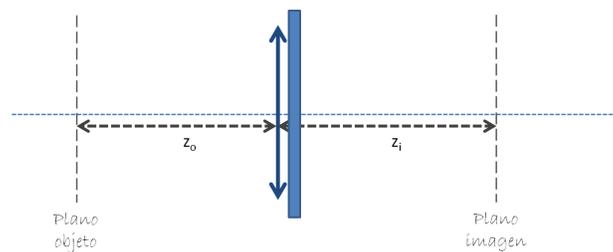


Figura 3.3: Modificación de la función de pupila

3.1 Antecedentes y nuevas propuestas.

el filtro que se encuentra justo después de la lente es el que modificará la función de pupila.

En 1993 se propuso el primer filtro de fase que extiende la DOF y corresponde a una placa de fase *cúbica* con una abertura de forma rectangular. Este filtro es caracterizado por dos cosas: primero, tiene un parámetro de control en la fase al que se le conoce como desviación de fase y se suele denotar por la letra griega α y entonces la función de pupila se expresa de la siguiente manera,

$$P_{rec}(u, v) = \text{rect}(u, v) e^{i\alpha(u^3+v^3)}. \quad (3.1)$$

comúnmente este parámetro es el que inhibe el desenfocamiento por lo tanto su representación mediante la función de transferencia óptica no presenta ceros al evaluar al sistema con una fuente puntual fuera de foco [1]. Para explicar un poco más esta característica de las placas que extienden la profundidad de campo analicemos la figura 3.4.

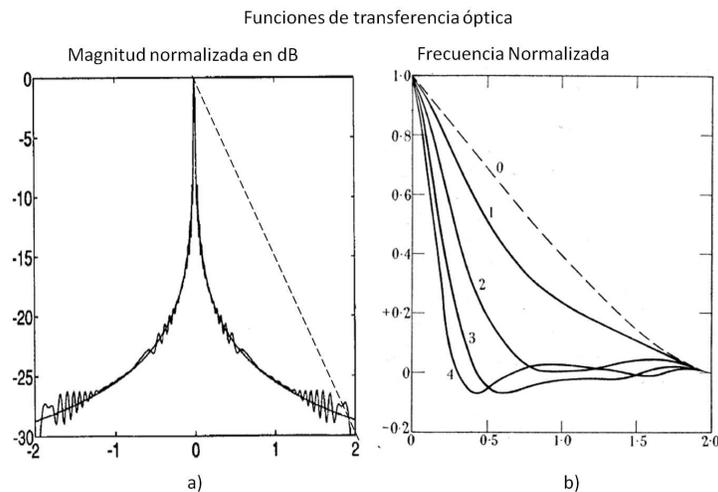


Figura 3.4: Funciones de transferencia en modulación. En a) MTF's de la placa de fase cúbica normalizada en DB tomada de la referencia [1]. En b) MTF's de un sistema óptico estándar libre de aberraciones con un rango de 0 a 2 longitudes de onda tomada de la referencia [2].

En la figura 3.4.a) se muestran las MTFs de la placa de fase con una $\alpha = 90$, a distintos desenfoques ($0 - 30\lambda$) con magnitud normalizada en dB; en la

3.2 Placa de fase cúbica.

figura 3.4.b) se muestran las MTF's del sistema óptico libre de aberraciones con desenfoque de $0 - 2\lambda$.

De estas dos gráficas se puede observar que el sistema que no tiene filtro de fase presenta ceros en su pasa-banda y eso significa que es sensible al desenfoque; al observar las respuestas de las MTF's de la placa de fase cúbica con abertura rectangular no presenta ceros en su pasa-banda y se dice que el sistema óptico es capaz de extender la profundidad de campo. Por lo tanto, los filtros que modifiquen la función de pupila que sean capaces de extender el DOF deben presentar esta característica en sus MTF's.

Segundo, a la imagen de los objetos codificados con la placa de fase se le conoce como imagen intermedia la cual presenta una distorsión causada por la placa de fase. Para obtener la imagen final es necesario un proceso digital, es decir, una deconvolución y para ello se requiere un filtro inverso.

3.2. Placa de fase cúbica.

Dada la forma geométrica del sistema formador de imágenes se propone un filtro de fase con la misma función cúbica pero con una abertura de forma circular. Convenientemente se usará el mismo parámetro para el control de desviación de fase, α , de tal manera que queda expresada de la siguiente forma,

$$P_{cc}(u, v) = \text{circ} \left(\sqrt{\frac{u^2 + v^2}{\rho_c}} \right) e^{ik\alpha \left(\frac{u^3 + v^3}{\rho_c^3} \right)}. \quad (3.2)$$

donde $P_{cc}(u, v)$ representa la función de pupila, las frecuencias espaciales son u y v asociadas con las coordenadas espaciales x y y , α está en términos de la longitud de onda.

Una vez con el diseño del filtro, la segunda etapa es conocer el comportamiento del sistema, es decir, conocer la función característica que define al

3.2 Placa de fase cúbica.

sistema formador de imagen. Para ello es necesario usar una fuente puntual, sin embargo, en condiciones reales no podríamos generar este experimento debido a que no existen las fuentes puntuales y solo se trata de una abstracción matemática útil al modelar el proceso de formación de imágenes.

Algunos autores han considerado que una solución es usar una fuente cuasi-puntual (*QPS*, por sus siglas en inglés). Estas fuentes cuasi-puntuales se conocen como aberturas de forma circular de radio r , donde r es expresada en términos de fracciones del radio del disco de Airy [28, 29].

Orlando et al., usaron la *Función de Distribución de Wigner*, (*FDW*), para determinar el radio del objeto que puede fungir como fuente cuasi-puntual. Se considera una fuente cuasi-puntual bajo el siguiente criterio: *La FDW de la imagen detectada debe ser positiva dentro de su ancho de banda del sistema óptico* [30].

Los resultados experimentales se obtuvieron usando un *microscopio óptico* convencional de marca Olympus modelo BX51 trabajando por transmisión, la iluminación es de tipo Köhler con una fuente de luz blanca cuyo espectro esta centrado en $\lambda = 550nm$ y un objetivo de microscopio con una apertura numérica de $NA = 0,1$ y amplificación de $M = 4$; Otra característica del sistema formador de imagen es su detector CCD, fue tomado en cuenta que para los experimentos. Este detector es de marca Sony modelo XCL-5000 de tamaño $3,53mm \times 3,53mm$, se uso en un modo de operación de 1024×1024 pixeles con un tamaño de pixel de $3,45\mu m$, conviene mencionar que este tamaño del pixel es pequeño y esta característica ayuda a tener considerablemente una mejor resolución. Para estas características se encontró que un objeto que consiste de una abertura circular de diametro de $1\mu m$ puede ser considerada una fuente cuasi-puntual [30, 31].

En la figura 3.5 se muestra un esquema de un arreglo óptico para encontrar la respuesta en intensidad a la fuente cuasi-puntual para la función de pupila dada por la ecuación 3.2. La imagen de la IQPSF que se observa es recortada en los extremos, quedando aumentada al doble para que sea posible observarla desde esta perspectiva, además, conviene mencionar que para todas las simulaciones que se presentan de aquí en adelante se toman los parámetros que aparecen en la referencia [30].

3.2 Placa de fase cúbica.

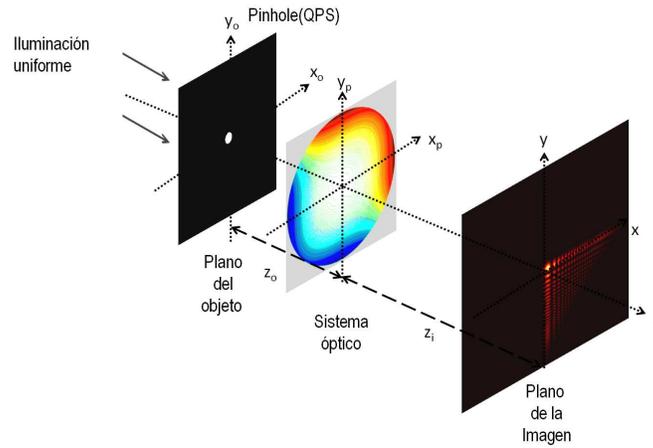


Figura 3.5: IQPSF usando placa de fase cúbica en la pupila.

Por otro lado, usando el análisis en frecuencias se puede encontrar la OTF asociada a la fuente-cuasipuntual(QOTF), si desenfoamos la QPS y encontramos la QOTF asociada a esta fuente cuasi-puntual entonces se puede predecir el comportamiento del sistema óptico. Al realizar una línea de barrido en el centro de la función de transferencia para las QPS 's desenfoadas entonces se encuentra un conjunto de funciones de transferencia óptica en dependencia del desenfoque como lo muestra la figura 3.6,

En la figura 3.6 se observa el conjunto de MTFs desenfoadas normalizadas al máximo valor de la MTF libre de aberraciones, este conjunto de funciones está evaluado en un rango de 0 a 2λ y con un $\alpha = 120$, de la misma figura se observa que ninguna de estas funciones de transferencia presenta ceros en su pasa banda, y eso se traduce a tener una prolongada extensión de la profundidad de campo.

Sin embargo, es preciso realizar un experimento numérico para observar si el comportamiento de esta placa de fase corresponde al análisis de las funciones de transferencia. Se propone un objeto de prueba y se colocan sobre el eje óptico a distintos planos fuera de la profundidad de campo.

La figura 3.7 muestra el esquema del sistema formador de imágenes usando en la pupila una función de fase cúbica, en el plano del objeto se colocó un objeto de prueba a una distancia z_0 , a otra distancia $z_0 + \Delta z_1$ se colocó el mismo objeto pero rotado y finalmente, otro objeto fue colocado a una distancia

3.2 Placa de fase cúbica.

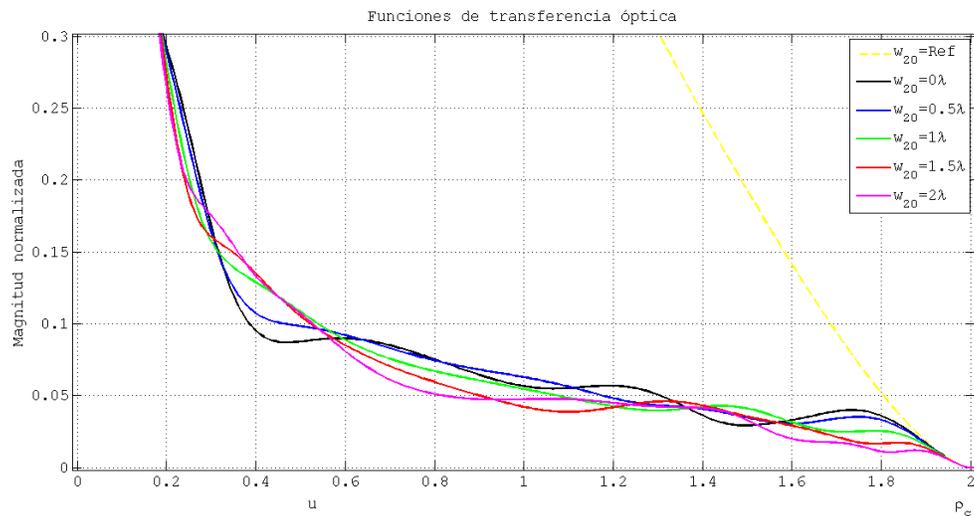


Figura 3.6: MTF's asociadas a las QOTF's desenfocadas, el grado de desenfoco es de $0 - 2\lambda$ y la *Ref* es el sistema libre de aberraciones. Todas están normalizadas y se muestra solo una sección que está muy cerca de la frecuencia de corte.

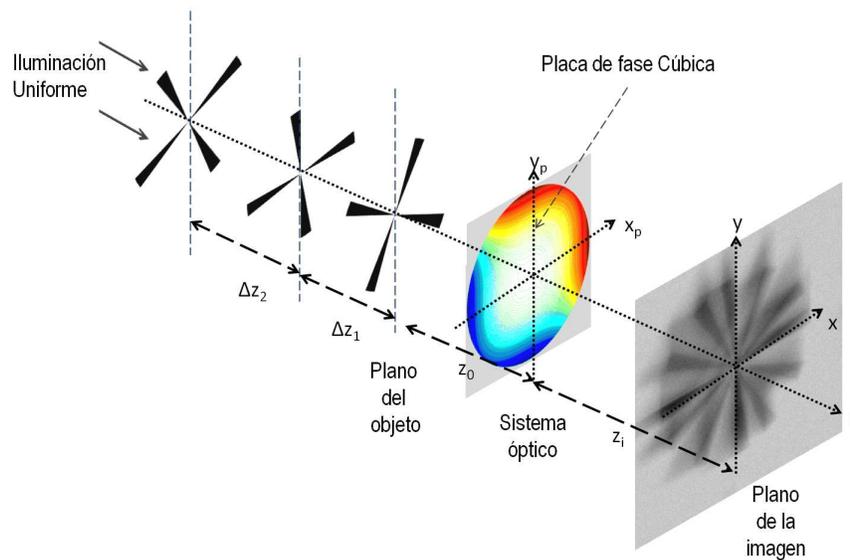


Figura 3.7: Objetos a distintas posiciones, codificados usando placa de fase cúbica.

3.2 Placa de fase cúbica.

$z_0 + \Delta z_1 + \Delta z_2$ y con otra rotación.

Tal como se ha planteado en el proceso de formación de imágenes con el método de la modificación de la función de pupila para extender el campo, es necesario realizar un proceso digital para la obtención de la imagen final. Se uso un filtro de *Wiener* para realizar la deconvolución del objeto de una imagen intermedia, este filtro se construyó usando las *IQPSF*. Un estimado del objeto se puede obtener de la transformada inversa de Fourier del espectro de la siguiente expresión,

$$\check{O}(u, v) = \frac{OTF^*(u, v)G_i(u, v)}{|OTF(u, v)|^2 + \frac{P_n(u, v)}{P_s(u, v)}}, \quad (3.3)$$

donde $OTF(u, v)$ es el espectro de la IQPSF; $G_i(u, v)$ representa el espectro de la imagen intermedia; $\frac{P_n(u, v)}{P_s(u, v)}$ corresponde a la razón de la densidad espectral del ruido en la imagen [32]. El simbolo $[\ast]$ indica complejo conjugado. Es importante conocer a priori el cociente del denominador de la señal a ruido. En restauración de imágenes cuando la razón de señal a ruido no es conocida, este valor es heurísticamente ajustado para obtener una mejor calidad de la imagen [32, 33] en este caso se uso 1×10^{-6} .

De la teoría de formación de imágenes dada por la ecuación 2.24, si G_i corresponde a la imagen intermedia, entonces un estimado del espectro del objeto correspondería a la siguiente ecuación,

$$\check{O}(u, v) = \frac{OTF^*(u, v)\{OTF(u, v)O_i(u, v)\}}{|OTF(u, v)|^2 + \frac{P_n(u, v)}{P_s(u, v)}}. \quad (3.4)$$

Por lo que la imagen final es un estimado de la transformada de Fourier del objeto dada por la expresión 3.4.

3.2 Placa de fase cúbica.

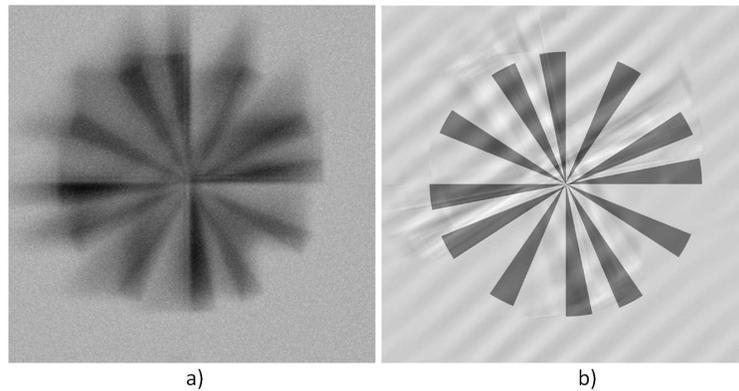


Figura 3.8: Imágenes intermedia y restaurada.

En la figura 3.8.a) se muestra la imagen intermedia de los tres objetos capturada simultáneamente, se puede observar que presenta una distorsión y no parece tener una mejor calidad, en la figura 3.8.b), se observa la imagen restaurada mediante un proceso de *deconvolución* para obtener la imagen final y se observan algunas franjas que aparecen en la imagen final, se notó que si el valor de α se aumenta las franjas desaparecen, sin embargo, este problema también podría ser ocasionado por el proceso numérico al usar la transformada de Fourier.

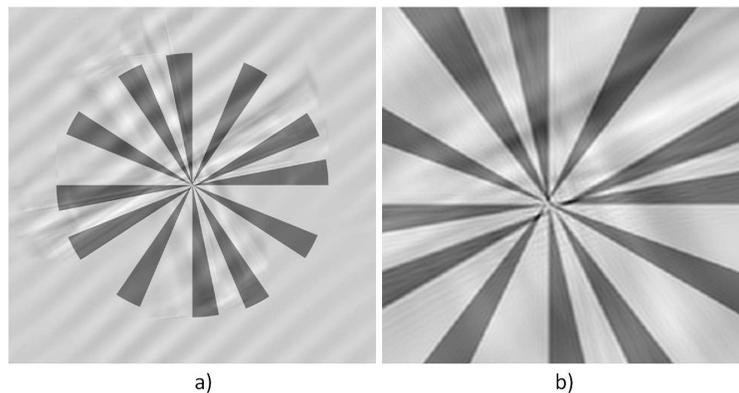


Figura 3.9: Imágenes restaurada, se realiza un acercamiento de la parte central de ambas imágenes restaurada.

Por simple inspección visual, se observa que la imagen restaurada presenta algunas replicas en el fondo y además la imagen del objeto presenta una

3.3 Placa de fase Modificada.

estructura muy similar a la de los objetos colocados en el eje. En la restauración también se observa que la placa de fase introduce un desplazamiento lateral en la posición de los objetos, y para notar este efecto, se realiza un acercamiento de la parte central de la imagen restaurada como se muestra en la figura 3.9.

3.3. Placa de fase Modificada.

Con el fin de eliminar el desplazamiento lateral que introduce la placa de fase cúbica, como se mostró en el ejemplo de la figura 3.9, se propone una nueva placa de fase que se nombrará placa de fase modificada y la representamos de la siguiente forma,

$$P_{cg}(u, v) = \text{circ} \left(\sqrt{\frac{u^2 + v^2}{\rho_c}} \right) e^{ik\alpha \left(\frac{u^3 - 3uv^2 - 3u^2v + v^3}{\rho_c} \right)}. \quad (3.5)$$

$P_{cg}(u, v)$ es la nueva función de pupila, la idea de considerar esta expresión de fase es que corresponde al polinomio completo de $(u + v)^3$ con esto se intento evitar el desplazamiento lateral que se aprecia cuando se usa la placa de fase anterior y es por esto que los términos cruzados se colocaron con signo negativo. De igual manera, como se mostró en la sección anterior se utiliza el concepto de QPS para evaluar la respuesta del sistema óptico, en la figura 3.10 se observa el arreglo óptico para obtener la IQPSF.

Y como en el caso anterior se realiza el tratamiento en frecuencia para conocer las QOTFs del sistema óptico cuando está desenfocado.

En la figura 3.11 se observa el conjunto de MTFs desenfocadas normalizadas al máximo valor de la MTF libre de aberraciones, este conjunto de funciones está evaluado en un rango de 0 a 2λ , se observa de la figura 3.11 que ninguna de estas funciones de transferencia tampoco presenta ceros en su pasa banda. Se simula el sistema usando objetos de prueba como se muestra en la

3.3 Placa de fase Modificada.

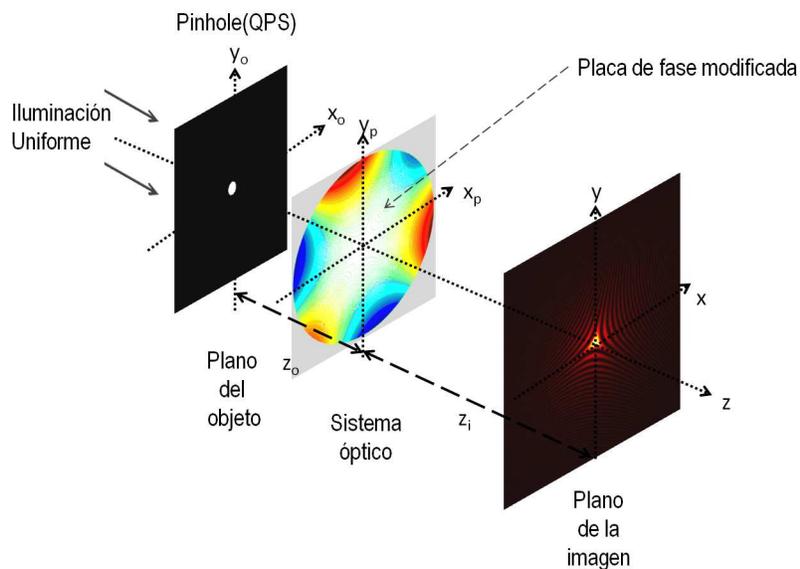


Figura 3.10: IQPSF usando placa de fase modificada con pupila circular.

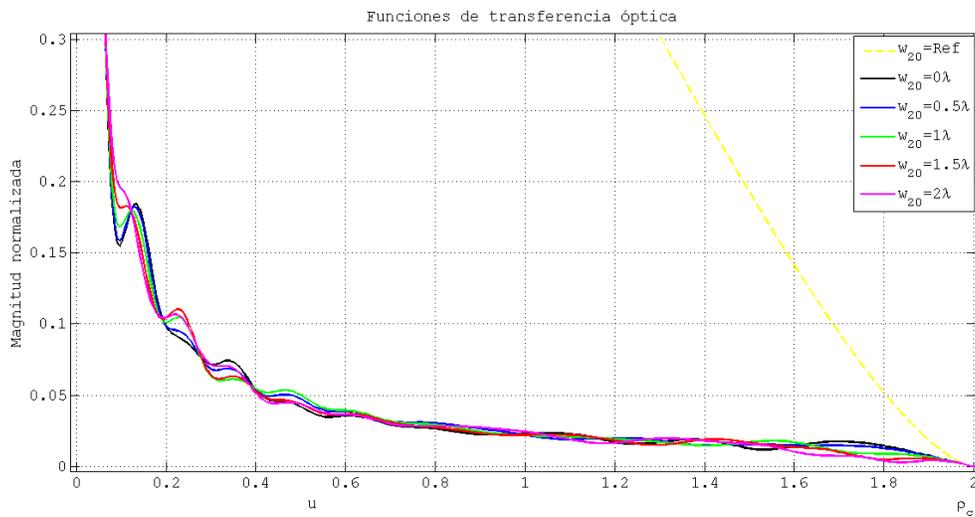


Figura 3.11: MTF's asociadas a las QOTF's desenfocadas, el grado de desenfoco es de $0 - 2\lambda$ y la *Ref* es el sistema libre de aberraciones. Todas están normalizadas y se muestra solo una sección que esta muy cerca de la frecuencia de corte.

3.3 Placa de fase Modificada.

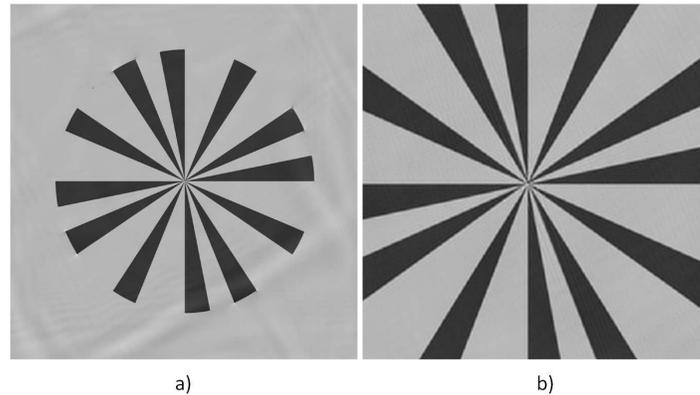


Figura 3.14: Imágenes restaurada y zoom de la parte central de la imagen restaurada.

se observa que no presenta tantas replicas en el fondo, la imagen restaurada presenta alto contraste y mejor resolución, además sin desplazamiento en el centro. En la figura 3.14.b) en comparación con la figura 3.9.b) se observa que, al menos desde un análisis visual, la placa de fase modificada tiene un mejor desempeño.

Una placa de fase muy similar a la placa modificada fue presentada en 2002 por Prasad et al donde introdujeron por primera vez el término de ingeniería de pupilas de fase, ellos propusieron un conjunto de placas de fase expresadas en términos de polinomios de Zernike que aumentan la profundidad de campo usando multi-parámetros para el control en la desviación de la fase, cada polinomio tiene un control de fase y cada uno de ellos es calculado usando métodos estadísticos y el óptimo es asignado para que la placa sea capaz de inhibir el desenfoque [15]; sin embargo, las diferencias importantes con la placa de fase modificada es en el control de desviación de fase solo usa un parámetro de control y no está expresada en polinomios de Zernike. Por otro lado, en 2011 Yuan y Preza propusieron una placa de fase similar a la de Prasad pero ellos intentaban eliminar la aberración esférica, también utilizaron multi-parámetro, ellos usan dos parámetros para el control de la fase y el cálculo se realiza mediante procesos estadísticos también [21]. En ambos casos, la placa de fase modificada presentada aquí es distinta a estas dos placas de fase antes referidas.

3.4. Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

Tal como se mencionó en la sección anterior, Prasad et. al propuso placas de fase diseñadas con la superposición de 6 polinomios de Zernike y optimizada con multi-parámetro para el control de la fase. La placa de fase modificada también se puede expresar en polinomios de Zernike y se puede ver que es una aberración de trifoil de tercer orden; se probaron resultados donde no había diferencia, al menos visual, entre usar la placa modificada y la placa de aberración trifoil.

Se probó otra aberración del mismo orden, la *coma*, y usando el mismo ejercicio numérico se observó que también era capaz de extender la profundidad de campo, por lo tanto, se sugiere realizar la suma de estas dos aberraciones para generar una nueva placa de fase. Es importante mencionar que se propone estas funciones para modificar la función de pupila del sistema óptico formador de imágenes con el fin de aumentar la profundidad de campo. Se probó el sistema óptico formador de imágenes con otros objetos y el resultado fue alentador.

La placa de fase que se propuso es la superposición de 4 polinomios de Zernike, Z_7 , Z_8 , Z_9 y Z_{10} , los cuales corresponden a las aberraciones primarias de coma y trifoil en ambas direcciones (x y y) [34], tal como se mencionó:

$$Z_7 = \sqrt{8}(3\rho^3 - 2\rho) \sin \phi, \quad (3.6)$$

$$Z_8 = \sqrt{8}(3\rho^3 - 2\rho) \cos \phi, \quad (3.7)$$

$$Z_9 = 3\sqrt{8}\rho^3 \sin 3\phi, \quad (3.8)$$

$$Z_{10} = 3\sqrt{8}\rho^3 \cos 3\phi, \quad (3.9)$$

donde $\phi = \tan^{-1}(v/u)$ y $\rho = (u^2 + v^2)^{1/2}$, las frecuencias espaciales son u y v en las direcciones x y y . Por lo tanto la expresión de fase es la suma de estos cuatro términos y queda de la siguiente manera,

$$Z_{tot} = Z_7 + Z_8 + Z_9 + Z_{10}. \quad (3.10)$$

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

La ecuación 3.10 es usada como factor de fase e introducida en la función de pupila del sistema óptico como se expresa en la siguiente ecuación,

$$P_{pz}(\rho, \phi) = \text{circ} \left(\sqrt{\frac{u^2 + v^2}{\rho_c}} \right) e^{i k \alpha Z_{tot}(\rho, \phi)}, \quad (3.11)$$

donde $P_{pz}(\rho, \phi)$ es la función de pupila, α es el parámetro de control de desviación de la fase y está en términos de la longitud de onda como ya se mencionó. En la figura 3.15 se muestra la forma de la superficie de la placa de fase dada por la ecuación 3.11. En 3.15.a, se observa un pico en el borde de la pupila y cae abruptamente en el lado diametralmente contrario, teniendo oscilaciones en la parte central. En 3.15.b se muestra un mapa de contornos de la misma superficie.

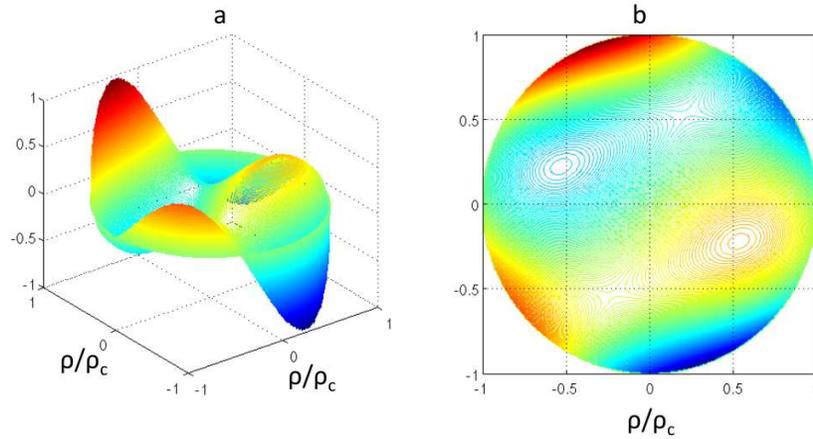


Figura 3.15: Forma de la superficie de la placa de fase usando la ecuación 3.10. a) gráfica en 3-D. b) mapa de contornos.

Es importante mencionar que la superficie que tiene la placa de fase es complicada y difícil de construir en dado caso de quererla fabricar con algún

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

material como el vidrio.

Además, se hace uso de un filtro apodizador de tipo Gaussiano con el fin de incrementar la profundidad de campo, ver ecuación 3.12. En 1988 Ojeda et al demostraron que el filtro Gaussiano suaviza la caída abrupta de la función de fase en los bordes de la pupila [27],

$$p_g(\rho) = 10 \exp \left[- \left(\frac{3\rho}{\rho_c} \right)^2 \right], \quad (3.12)$$

con las ecuaciones 3.11 y 3.12 se construye una nueva función de fase,

$$P_{pzg}(\rho, \phi) = e^{i 2\pi \alpha Z_{tot}(\rho, \phi)} \text{circ}(\rho) p_g(\rho). \quad (3.13)$$

la ecuación 3.13 es ahora la nueva función de pupila a la cual se evaluará usando el concepto de la *QPS* como se hizo anteriormente.

Antes de probar el sistema óptico, es necesario fijar el valor del parámetro de control de la desviación de la fase, α , se usa para ello la función conocida como diferencias al cuadrado (d), como lo muestra la siguiente ecuación,

$$d(\alpha) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n |r_{i,j}(\alpha) - s_{i,j}|^2, \quad (3.14)$$

donde $r_{i,j}(\alpha)$ es la intensidad en posición (i, j) de la imagen restaurada dada por α , y $s_{i,j}$ es el punto de muestra del objeto en la posición equivalente.

De este modo, se prueba la diferencia al cuadrado entre la imagen restaurada y el objeto (con todos los elementos en foco), para α en el rango de 0 – 100. Se usa el valor mínimo de la diferencia el cual corresponde a $\alpha = 77$. La

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

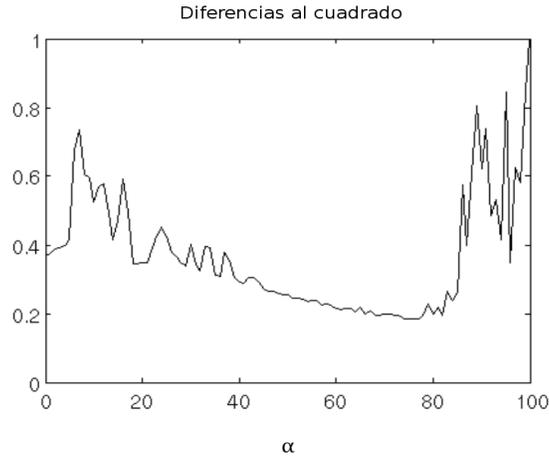


Figura 3.16: Diferencia al Cuadrado para seleccionar el valor de α .

gráfica en la figura 3.16 muestra el resultado.

Conviene mencionar que al proponer una nueva placa de fase, es necesario evaluar el sistema óptico usando la abstracción matemática, fuente puntual, y con la *QPS*, es por eso que en la figura 3.17 se muestran los resultados numéricos de las respuestas a la fuente puntual (IPSF) y las respuestas a la fuente cuasi-puntual (IQPSF). Además es importante mencionar que se consideran los casos para la pupila sin apodizador, ecuación 3.11, y con apodizador, ecuación 3.13.

Por inspección visual de la figura 3.17, las figuras 3.17.(a) y 3.17.(c) y las figuras 3.17.(b) y 3.17.(d) son bastante similares debido al uso de la misma función de pupila. En las figuras 3.17.(b) y 3.17.(d) se usó el filtro apodizador, se observa que las respuestas son más limpias, es decir, que no presentan replicas como en las figuras 3.17.(a) y 3.17.(c).

Por otro lado, con el análisis en frecuencia también se puede conocer el sistema cuando se desenfoca la QPS como se muestra en la figura 3.18, En la figura 3.18 se observan también las MTF's desenfocadas y normalizadas a la unidad en ambas figuras, están normalizadas a la frecuencia espacial de corte.

Se presenta también el análisis en frecuencia al usar el filtro apodizante en

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

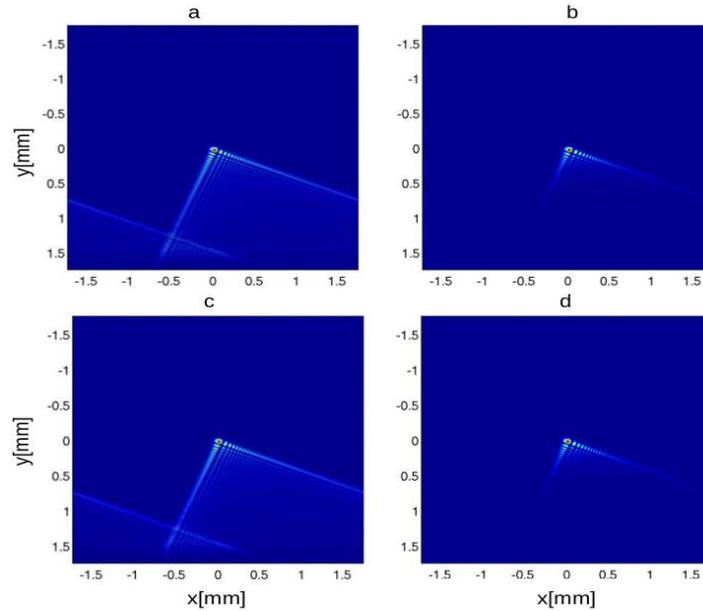


Figura 3.17: Respuestas a la fuente puntual y fuente cuasi-puntual. En (a) y (b) las IPFS's, en (c) y (d) las IQPSF's; (a) y (c) sin filtro apodizador, en (b) y (d) con filtro apodizador.

la pupila,

En la figura 3.19 se observan también las QOTF's desenfocadas y normalizadas a la unidad en ambas figuras, están normalizadas a la frecuencia espacial de corte.

Al igual que en las dos secciones anteriores, se presenta una simulación numérica para conocer el desempeño de esta placa de fase. A continuación se muestra un diagrama general del arreglo del sistema óptico simulado, nótese que también se observan algunas posiciones sobre el eje, donde se colocaran los objetos.

De la figura 3.20, el desenfoco comenzará en las posiciones Δz_1 , Δz_2 y Δz_3 respectivamente, los objetos son estrellas de Siemens con 32 rayos colocados fuera del eje óptico y dentro del campo, considerando los parámetros del detector como se expuso en la sección 2.4. Se tomó en cuenta la profundidad de campo del sistema sin placa de fase, $\delta z_0 = \mp[\lambda/2(NA)^2M^2]$, esto es $1,72\mu m$. En la tabla 3.1 se muestran las posiciones donde se colocaron los objetos.

Con el fin de tener una referencia básica, se obtiene una imagen sin el uso de ninguna placa de fase; se realizarán las comparaciones con las imágenes

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

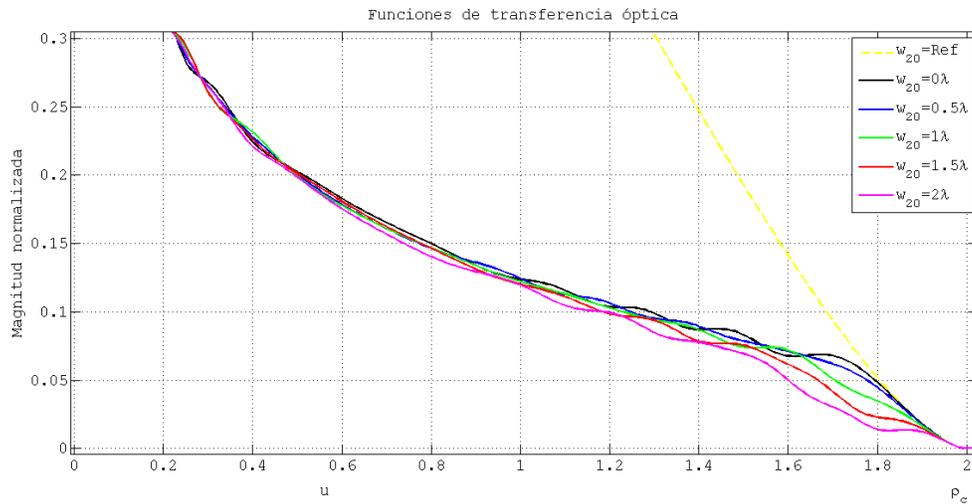


Figura 3.18: MTF's asociadas a las QOTF's desenfocadas, el grado de desenfoque es de $0 - 2\lambda$ y la *Ref* es el sistema libre de aberraciones. Todas están normalizadas y se muestra solo una sección que esta muy cerca de la frecuencia de corte.

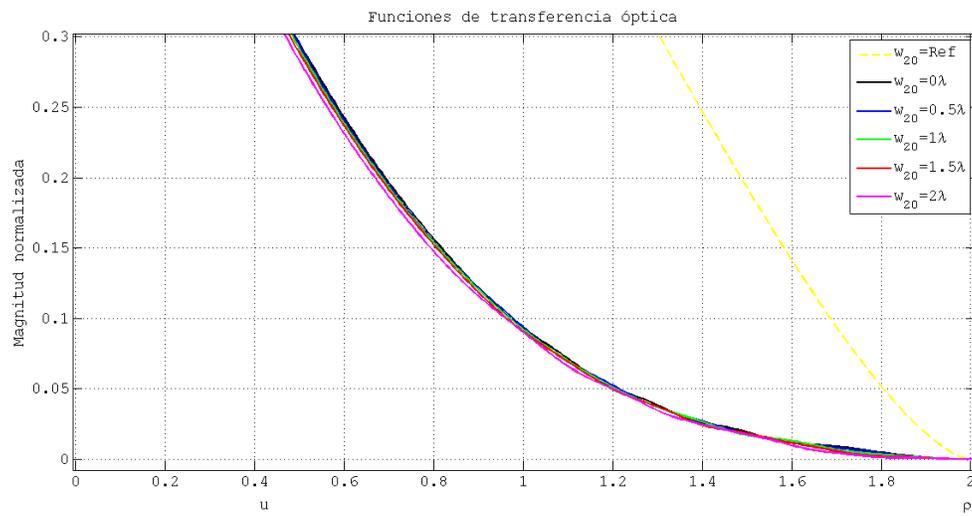


Figura 3.19: MTF's asociadas a las QOTF's desenfocadas usando filtro apodizante en la pupila, el grado de desenfoque es de $0 - 2\lambda$ y la *Ref* es el sistema libre de aberraciones. Todas están normalizadas y se muestra solo una sección que esta muy cerca de la frecuencia de corte.

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

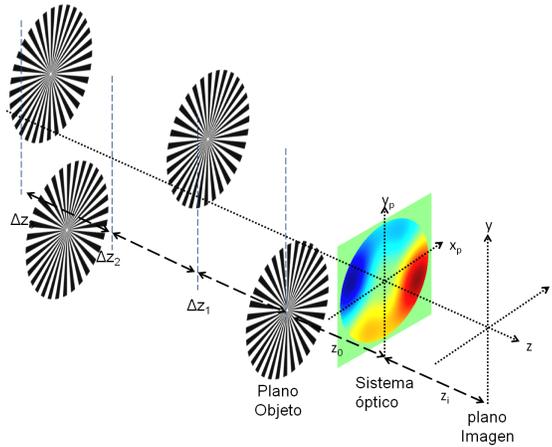


Figura 3.20: Experimento numérico de cuatro objetos colocados fuera de eje y desenfocados.

Tabla 3.1: Posición de los objetos en el sistema óptico.

Índice	Objeto	Posición (μm)		
		z	x	y
1	plano del objeto	z_0	0	-215.4
2	$z_0 + \Delta z_1$	$z_0 + 148$	0	215.4
3	$z_0 + \Delta z_1 + \Delta z_2$	$z_0 + 296$	137	-51.7
4	$z_0 + \Delta z_1 + \Delta z_2 + \Delta z_3$	$z_0 + 740$	129.3	0

obtenidas usando una placa de fase.

La figura 3.21 muestra la imagen de los objetos sin ninguna máscara de fase. Conviene mencionar que las imágenes de los objetos fueron obtenidos ó capturados simultáneamente, y la degradación esta dada por las diferentes cantidades de desenfoco que tiene cada objeto. Es posible apreciar que en la imagen de los objetos con mayor cantidad de desenfoco no se aprecia su estructura.

En la figura 3.22, se muestran las imágenes intermedias, 3.22.a y 3.22.b.

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

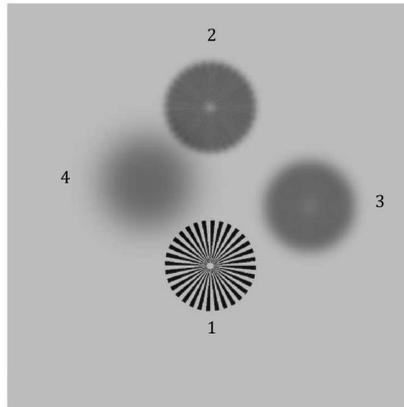


Figura 3.21: Imagen de los cuatro objetos capturados simultáneamente, con diferentes cantidades de desenfoco y usando un sistema óptico sin placa de fase.

La fig 3.22.a corresponde a la imagen obtenida sin filtro apodizador; se observa un emborronamiento y parecería que será imposible de restaurar con un post-procesamiento.

La figura 3.22.b fue codificada con el filtro apodizador; estas dos imágenes presentan el mismo grado de desenfoco.

En 3.22.c y 3.22.d se muestran las imágenes restauradas de las figuras 3.22.a y 3.22.b respectivamente.

En las imágenes de 3.22.c y 3.22.d, los cuatro objetos son mostrados con una gran calidad, sin embargo, en 3.22.c el fondo más ruidoso comparado con el que aparece en 3.22.d, por lo tanto esta última es la mejor calidad de imagen en nuestra simulación.

En el caso de la placa cúbica, las imágenes intermedias y restauradas son presentadas en la figura 3.23. En 3.23.a se muestra la imagen intermedia usando solo la placa cúbica en la pupila, en 3.23.b se muestra la imagen intermedia usando la placa cúbica más el filtro Gaussiano en la pupila.

Las figuras 3.23.c y 3.23.d corresponden a las imágenes restauradas de 3.23.a y 3.23.b, respectivamente.

En la parte central de los objetos, se encuentra el contenido de altas frecuencias y se observa que no se reconstruyeron propiamente. En 3.23.d se ve observa mas limpia, esto es debido a la presencia del filtro apodizador en la

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

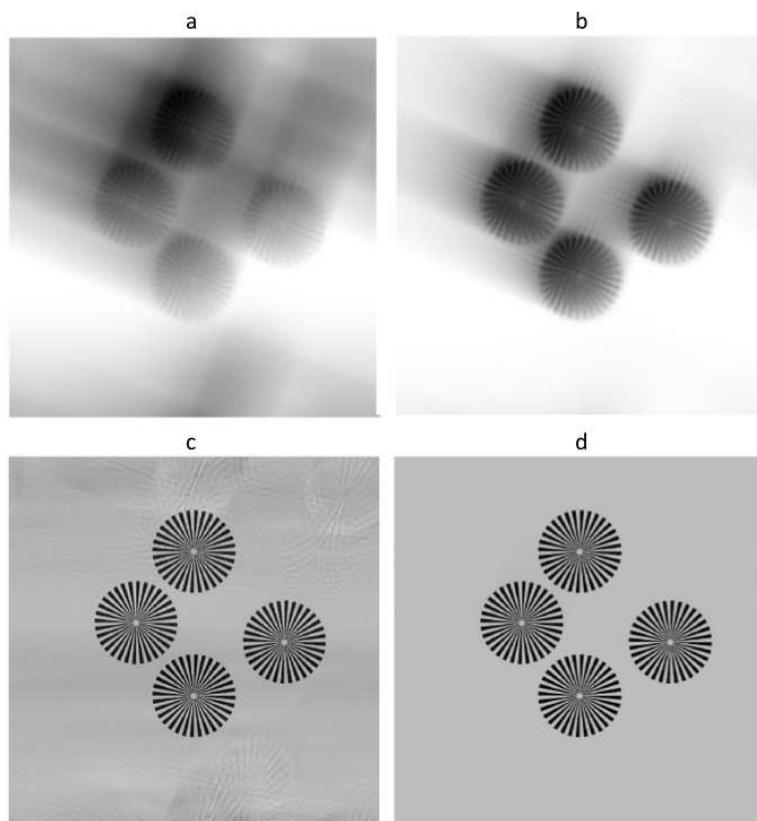


Figura 3.22: Imágenes obtenidas con la placa propuesta. En (a) y (b) las imágenes intermedias, en (a) sin apodizador, y (b) usando apodizador; (c) y (d) son las imágenes restauradas de (a) y (b) respectivamente.

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

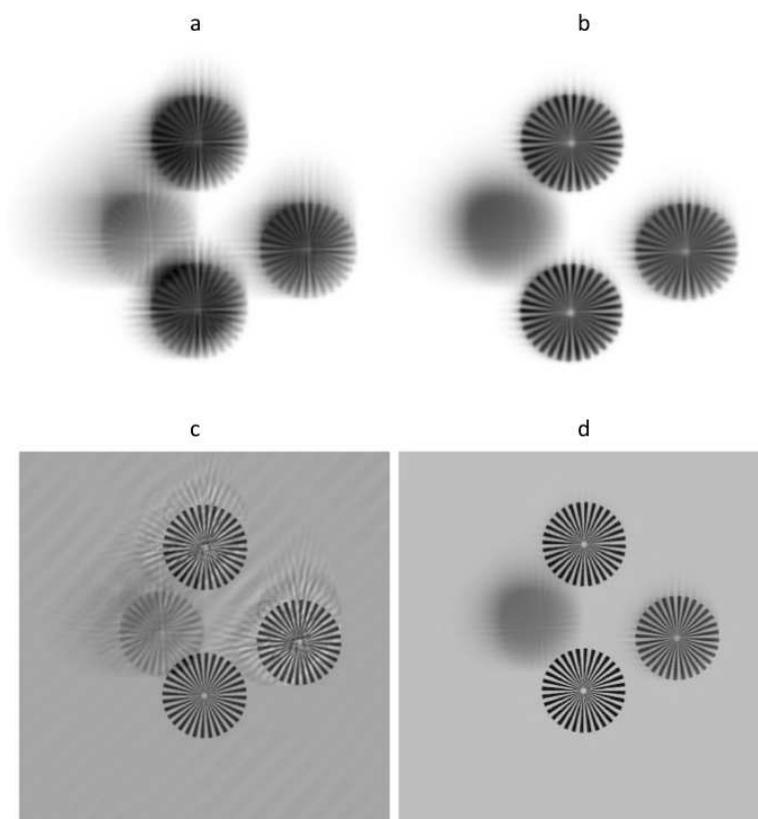


Figura 3.23: Imágenes obtenidas con una placa de fase cúbica de pupila circular. En (a) y (b) las imágenes intermedias, en (a) sin apodizador, y (b) usando apodizador; (c) y (d) son las imágenes restauradas de (a) y (b) respectivamente.

3.4 Placa de fase usando superposición de cuatro polinomios de Zernike.

pupila. El proceso de restauración ha permitido apreciar la estructura de los objetos, aunque estos estén desenfocados.

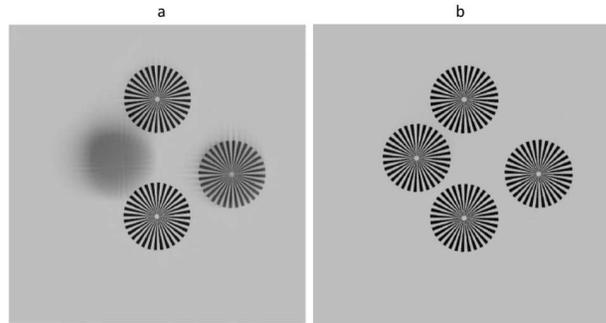


Figura 3.24: Comparación de las imágenes restauradas. En (a) la imagen restaurada usando un sistema óptico con una placa de fase cúbica de pupila circular, (b) imagen restaurada usando la placa de fase propuesta.

Finalmente en la figura 3.24, se muestran las mejores restauraciones de la imagen usando la codificación de la típica placa de fase cúbica y la mejor imagen restaurada usando la codificación con la placa de fase propuesta en esta tesis. Esto es con el fin de hacer evidentes las ventajas de usar esta propuesta en la pupila en comparación con la placa de fase cúbica. Con esto se termina la propuesta teórica de la tesis, en el siguiente capítulo se verifica experimentalmente estas propuestas.

Capítulo 4

Trabajo experimental

En este capítulo se describe el trabajo experimental que se llevó a cabo con el fin de probar los resultados teóricos que se han presentado en los capítulos anteriores. Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de super resolución del Instituto de Ciencias Fotónicas (ICFO) en Barcelona España bajo la responsabilidad del Dr. Pablo Loza-Alvarez.

Se utilizó un arreglo experimental empleando una técnica de microscopia de fluorescencia la cual se caracteriza porque es apropiada para obtener imágenes en 3D. Esta técnica de microscopia es conocida como Iluminación Selectiva de un Plano en Microscopía, (SPIM, por sus siglas en inglés). La hoja de iluminación excita la muestra y la fluorescencia de la muestra es colectada por un objetivo de microscopio como se muestra en la figura 4.1 [35].

Sin embargo, un problema para cuando se obtienen imágenes en 3D es que al desplazar la muestra biológica para realizar el barrido puede provocarse un daño al objeto. Una solución inteligente y muy interesante para el barrido de la muestra es mover el plano de iluminación o comúnmente conocido como hoja de luz, pero solo las imágenes que están dentro de la profundidad de

campo estarán bien enfocadas. Este problema se volvió un reto y para resolverlo se emplearon algunos elementos de óptica adaptiva en el arreglo óptico con el fin de introducir filtros de fase en la pupila y extender la profundidad de campo.

4.1. Técnica de hoja de Luz

La Fluorescencia es un fenómeno de luminiscencia y probablemente la técnica mas importante en el análisis de muestras biológicas y medicina en microscopia. Cuando una muestra biológica es marcada con alguna sustancia química por ejemplo con el fluorocromo, el tejido solo puede ser excitado con una radiación de una longitud de onda particular la muestra absorbe esta energía para después emitir otra energía con otra longitud de onda mayor a la que se utilizó para excitarla [36].

Las muestras biológicas que se emplearon están marcadas para una longitud de onda de absorción de $488nm$ (azul) y la longitud de onda de emisión $524nm$ (verde).

Una manera más simple de obtener una hoja de luz es la que se muestra en la figura 4.1, se usa una lente cilíndrica(cyl) que genera una hoja de luz dentro de una cámara de inmersión(ch), esta hoja ilumina la muestra y la fluorescencia de la muestra en el plano seleccionado es colectada por un objetivo de microscopio(det obj) [35].

La luz que llega a la lente cilíndrica(cyl)) tiene una longitud de onda de $488nm$ es con la que se ilumina a la muestra. La iluminación selectiva dada por la hoja de luz proporciona seccionamiento óptico en la muestra, y el grado de esta capacidad depende del espesor de la hoja de luz (t), la hoja de la luz mejora la resolución axial de la SPIM si es más delgada que la extensión axial de la PSF de detección, es decir, si el espesor (t) de la hoja es mas delgada que la psf del sistema óptico formador de imágenes.

El espesor mínimo de la hoja de la luz es inversamente proporcional a la NA de la lente de iluminación. El ancho de esta delgada cintura, es decir, su extensión a lo largo del eje de iluminación es inversamente proporcional a su

4.1 Técnica de hoja de Luz

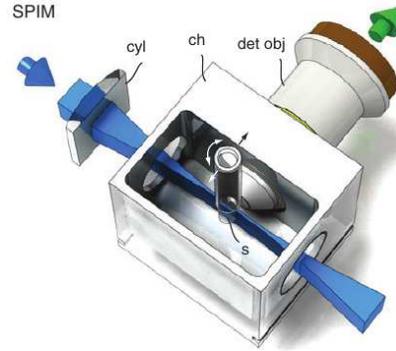


Figura 4.1: Principio básico del SPIM.

NA^2 , (ver figura 4.2).

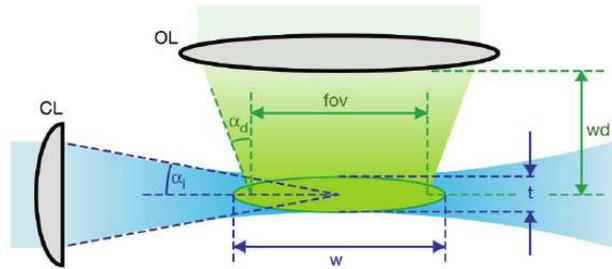


Figura 4.2: Características de la hoja de luz.

donde CL es la lente cilíndrica, $NA_{Illum} = n \sin \alpha_i$ y es la abertura numérica de iluminación; t es el espesor de la hoja de luz; w es el ancho de la hoja de luz. OL es el objetivo de detección con una abertura numérica de detección $NA_{det} = n \sin \alpha_d$; fov es el campo de visión y wd es la distancia de trabajo del objetivo de microscopio [36].

$$t = \frac{\lambda}{NA}, \quad (4.1)$$

$$fov = \frac{\lambda}{NA^2}, \quad (4.2)$$

Sin embargo, cuando uno considera que es deseable tener la extensión de la sección óptica uniforme en todo el campo de visión (FOV), llega a ser

4.1 Técnica de hoja de Luz

claro que es necesario tener el ancho de la hoja de luz, (w), tan grande como la detección la campo de visión, es decir que la hoja sea suficientemente delgada y ancha para iluminar la muestra dentro del campo. Por lo que el diseño óptico del SPIM implica un compromiso entre el seccionamiento óptico y un gran campo de visión, la forma más sencilla de equilibrar estos dos parámetros es cambiar la longitud focal de la lente cilíndrica ó el tamaño de su abertura debido a que al modificar el tamaño, el espesor se hace mas pequeño y el campo de visión también reduce [37].

El sistema óptico que se usó en laboratorio es un arreglo óptico-digital, en este sistema híbrido el haz de excitación se propaga a lo largo del eje x y la hoja de luz se genera en el plano de la muestra xy como lo muestra la figura 4.3.

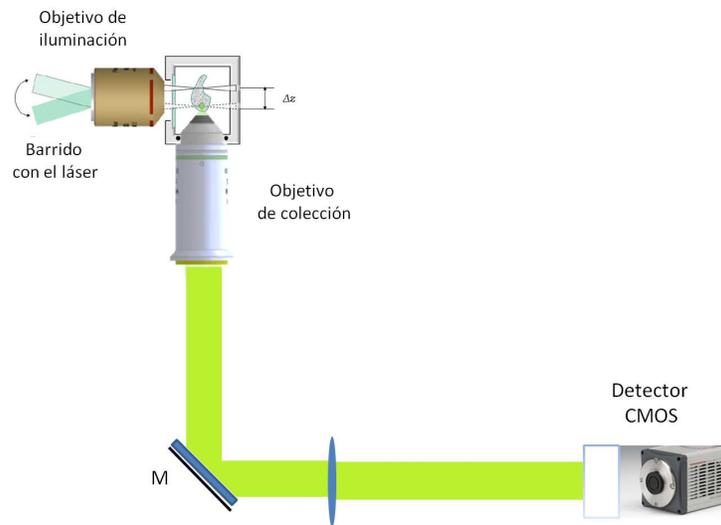


Figura 4.3: Arreglo óptico de LSFM.

El *objetivo de excitación* tiene una abertura numérica de 0,3 ($NA = 0,3$) y una amplificación de 10 ($M = 10$); se excita con un láser de estado sólido marca *Cobolt* que emite una longitud de onda de $488nm$. La colección de la luz emitida ó fluorescente se realiza con un objetivo de microscopio de abertura numérica de 0,5 ($NA = 0,5$) y amplificación de 20 ($M = 20$), la longitud de onda emitida es de $524nm$. Es importante conocer las características de la hoja de luz que se utilizó y en la siguiente sección se describe el modo de

4.2 Caracterización.

caracterizar este sistema.

4.2. Caracterización.

Para conocer las características de la hoja de luz es necesario medir el diámetro del haz del láser y el tamaño de la hoja de luz con el fin de encontrar el campo de visión y el espesor de la hoja de luz. Se realizó una medición en dependencia de la abertura numérica (NA) con el uso de un diafragma el cual dejará pasar o no, todo el tamaño del haz.

Conviene mencionar que las mediciones del tamaño del haz y de la hoja de luz se realizan de forma manual, es decir, el diafragma se va abriendo poco a poco y cada vez que se abre se realiza una medición de la cual se extrae información leyendo la imagen capturada en la dirección x para el caso del haz de iluminación; para el caso de la hoja de luz, la lectura es en las direcciones x, y tal y como se ejemplifica en la figura 4.4.

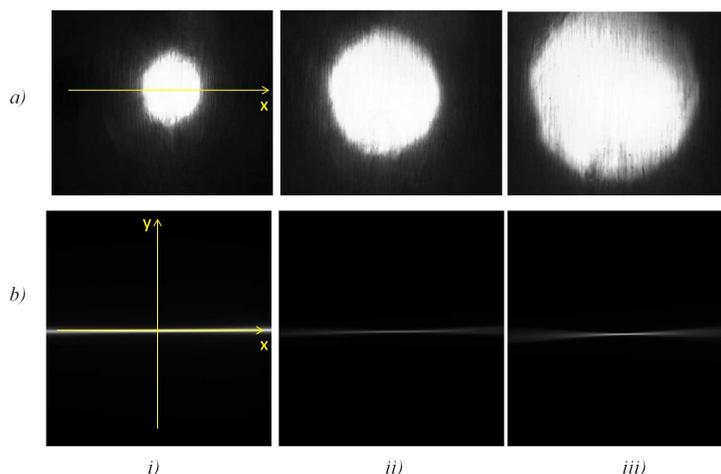


Figura 4.4: Algunas mediciones de la abertura NA y del ancho de la hoja. En $a)$ se muestra la medición de la NA con una línea de barrido en x . En $b)$ el ancho del campo de visión, la línea de barrido en x es el ancho del campo de visión y la línea de barrido en y es el espesor de la hoja de luz.

4.2 Caracterización.

De la figura 4.4.a) corresponden solo a algunas mediciones para encontrar el tamaño de la abertura numérica (NA) realizando una línea de barrido en la dirección x , en 4.4.b) se midió el ancho del campo de visión cuando la línea de barrido es en la dirección x , y el espesor de la hoja cuando la línea de barrido es en la dirección y . En total se capturaron 14 imágenes, 7 para la hoja de luz y 7 para el haz de luz de iluminación, para cada una se encontró el ancho medio ($FWHM$ por sus siglas en inglés). Esto con el fin de encontrar una correspondencia con las ecuaciones 4.1 y 4.2, se realizó un ajuste numérico obteniendo las figuras 4.5 y 4.6.

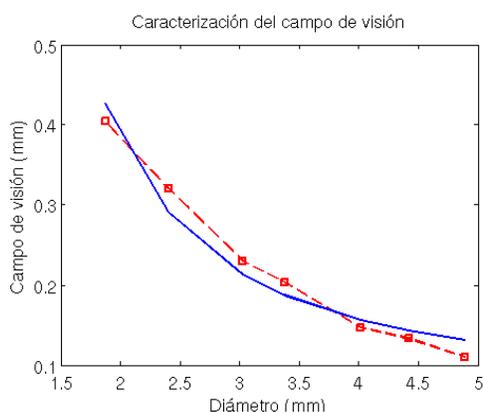


Figura 4.5: Campo de visión de la hoja de luz. La línea roja corresponde a los valores medidos experimentalmente y la línea azul al ajuste numérico.

En ambos casos, la línea roja corresponde a los valores medidos experimentalmente y la línea azul al ajuste numérico, por lo que se encontró que el f_{ov} es de un tamaño de $2,29mm$ y el espesor de $4,95\mu m$.

4.3 Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

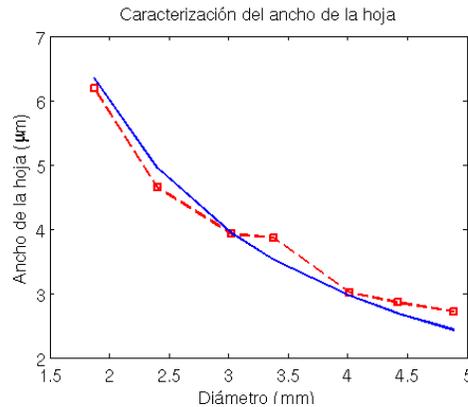


Figura 4.6: Espesor de la hoja de luz. La línea roja corresponde a los valores medidos experimentalmente y la línea azul al ajuste numérico.

4.3. Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

Tal como se mencionó al principio de este capítulo, se hizo uso de un par de elementos de óptica adaptiva para que con la habilidad de un espejo deformable se pueda codificar la pupila. La pupila correspondiente al objetivo de colección se conjugó con la superficie del espejo deformable. En el siguiente esquema se observa el arreglo óptico donde se incluyen estos elementos.

La figura 4.7 muestra un sensor de frente de onda (Sensor WF), Shack-Hartmann; un espejo deformable (DM). El sensor de frente de onda tiene 40×32 micro-lentes de $4,5 \times 3,6 \text{ mm}^2$; el espejo tiene 52 actuadores con un pico-valle (PV) de $\pm 50 \mu\text{m}$, ambos elementos son producidos por la industria *Imagine Optics*.

Para la evaluación del sistema óptico formador de imágenes se colocaron microesferas fluorescentes que juegan el papel de una fuente cuasi-puntual, QPS [31]; cada microesfera tiene un tamaño de $1 \mu\text{m}$ de diámetro. En el arreglo óptico de la figura 4.7 la luz que sale de la pupila del objetivo de colección es llevada por un sistema telescópico por las lentes L1 y L2 a la superficie del espejo deformable y del espejo deformable se lleva al detector (CMOS). Sin embargo, aunque el sistema tiene la mejor alineación posible, es necesario

4.3 Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

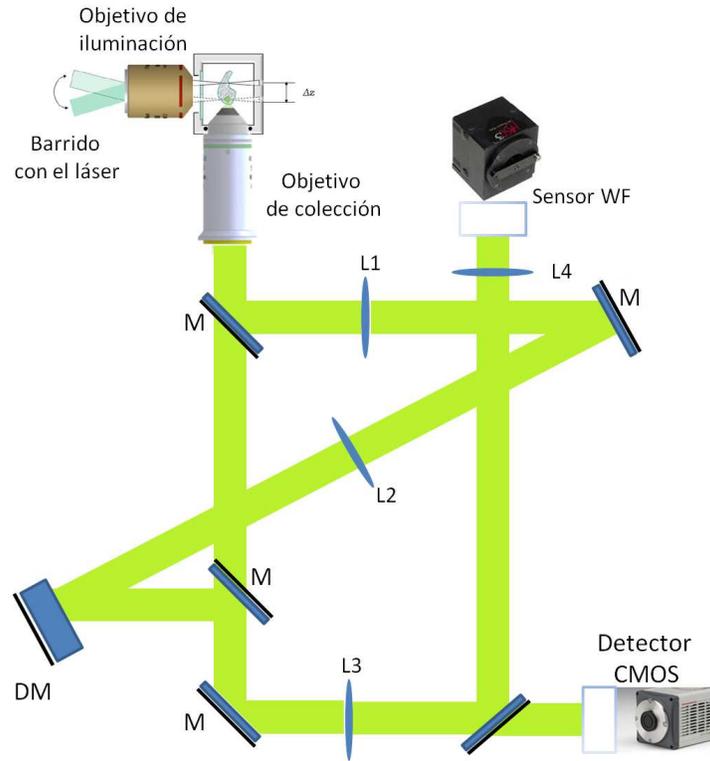


Figura 4.7: Arreglo óptico del SPIM usando elementos de óptica adaptiva, para corregir las aberraciones del sistema y codificar otros frentes de onda.

realizar un lazo cerrado para corregir las aberraciones que presente el sistema óptico y asegurar que la superficie del espejo sea lo más plana posible, para ello se usó el software *casao*, que viene con el sensor de frente de onda y el espejo deformable. En la figura 4.8 se muestra una medición de la microesfera antes de corregir el sistema [38, 39].

Se puede observar de la figura 4.8 que en la parte superior izquierda aparecen los parámetros de la medición, por ejemplo el pico-valle, el valor RMS, las inclinaciones, tilt, en las direcciones x , y . En la figura 4.9 se muestra el frente de onda corregido.

De la figura 4.9 es importante mencionar que sobre este frente de onda y sobre esta superficie corregida se codificaron las placas de fase que se estudiaron en el Capítulo 3.

Es posible codificar sobre la superficie del espejo deformable una función en polinomios de Zernike ó Legendre por ejemplo. El software que maneja el

4.3 Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

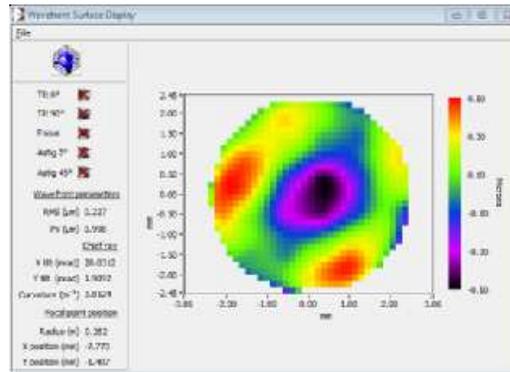


Figura 4.8: Aspecto de la pantalla del software Shack-Hartmann de la medición del frente de onda de una microesfera sin corregir el sistema óptico.

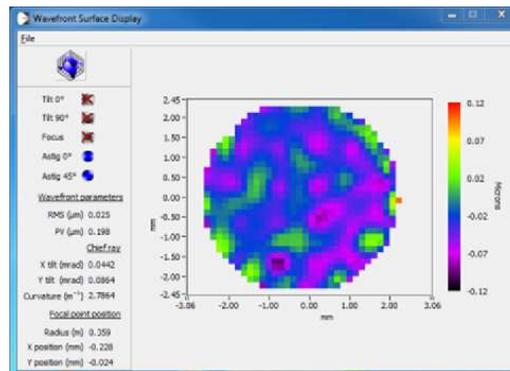


Figura 4.9: Frente de onda corregida después de un lazo cerrado.

espejo deformable se llama *Hasao*, se selecciona el tipo de polinomios que uno se van a usar. En este caso, la codificación sobre la superficie del espejo es usando polinomios de Zernike, así que se realizará la representación matemática en las siguientes secciones.

El parámetro de control de la desviación de fase experimental, α , está en términos de la longitud de onda, sin embargo, para encontrar el valor experimental que se usó en la desviación de fase proponemos la siguiente expresión,

$$\alpha_{exp} = \frac{2\pi}{\lambda} \alpha. \quad (4.3)$$

4.3 Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

Donde α_{exp} es el parámetro de control experimental y α es el pico valle para $10\mu m$ y $20\mu m$ por lo que $\alpha_{exp} \approx 120$ y $\alpha_{exp} \approx 240$ respectivamente. Estos valores son los que se utilizaron en las tres placas de fase y fueron seleccionados para evitar que los actuadores del espejo deformable se forzaran y se dañaran.

4.3.1. Modificación de la pupila usando una placa de fase cúbica

Para codificar este filtro de fase dado por la ecuación 4.4, es necesario expresarla en polinomios de Zernike, obviamente en coordenadas polares $f(\rho, \theta)$

$$f(x, y) = \alpha (x^3 + y^3) \quad (4.4)$$

donde $x = \rho \cos \theta$ y $y = \rho \sin \theta$, por lo que la ecuación anterior se expresa como sigue,

$$f(\rho, \theta) = \alpha (\rho \cos \theta)^3 + (\rho \sin \theta)^3 \quad (4.5)$$

reescribiendo la ecuación 4.5

$$f(\rho, \theta) = \alpha \rho^3 \cos^3 \theta + \alpha \rho^3 \sin^3 \theta \quad (4.6)$$

usando las siguiente identidades trigonométricas,

$$\cos^3 \theta = \frac{(3 \cos \theta + \cos 3\theta)}{4} \quad (4.7)$$

$$\sin^3 \theta = \frac{(3 \sin \theta - \sin 3\theta)}{4} \quad (4.8)$$

4.3 Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

se puede reescribir en la ecuación 4.6 usando las ecuaciones 4.7 y 4.8 quedando como sigue,

$$f(\rho, \theta) = \alpha \frac{3}{4} \rho^3 \cos \theta + \alpha \frac{1}{4} \rho^3 \cos 3\theta + \alpha \frac{3}{4} \rho^3 \sin \theta - \alpha \frac{1}{4} \rho^3 \sin 3\theta + \frac{\alpha}{2} \rho \cos \theta + \frac{\alpha}{2} \rho \sin \theta. \quad (4.9)$$

Si dejamos de lado al parámetro α y se observan detenidamente estos términos, se puede ver que los términos 2 y 4 corresponde a la aberración de trifoil; los términos 1 y 3 corresponden a una combinación de las aberraciones de coma primaria y los términos 5 y 6 corresponde al tilt.

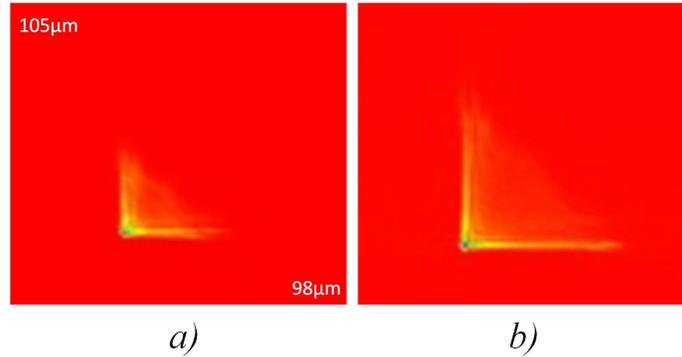


Figura 4.10: IQPSF's usando placa de fase cúbica con dos valores de α . En a) Una IQPSF con $\alpha = 10\mu m$. En b) una IQPSF con $\alpha = 20\mu m$.

La figura 4.10 muestra las respuestas en intensidad de una microesfera que fue colocada en el centro del campo de visión, en 4.10.a) se muestra la IQPSF para un pico valle de $10\mu m$ y en 4.10.b) la respuesta para cuando se uso un pico valle de $20\mu m$. El tamaño de la respuesta es en dependencia de α .

4.3.2. Modificación de la pupila usando una placa de fase cúbica generalizada

La expresión de la ecuación 4.10 representa la placa de fase cubica generalizada propuesta por Preza et al. [21], y también es necesario representarla en polinomios de Zernike.

$$f(x, y) = \alpha (x^3 + y^3) + \beta (x^2y + xy^2), \quad (4.10)$$

es por eso que se sustituye x y y en coordenadas polares como se realizó en la sección anterior resultando lo siguiente,

$$f(\rho, \theta) = \alpha \rho^3 \cos^3 \theta + \alpha \rho^3 \sin^3 \theta + \beta \rho^2 \cos^2 \theta \rho \sin \theta + \beta \rho \cos \theta \rho^2 \sin^2 \theta \quad (4.11)$$

conocemos la relación del primer termino de la ecuación 4.10, así que solo se usa el segundo término de la ecuación 4.10

$$\beta (x^2y + xy^2) = \beta \rho^2 \cos^2 \theta \rho \sin \theta + \beta \rho \cos \theta \rho^2 \sin^2 \theta \quad (4.12)$$

4.3 Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

se desarrolla la ecuación 4.6 con identidades trigonométricas y resulta la siguiente expresión,

$$\begin{aligned} &= \beta \rho^2 \cos^2 \theta \rho \sin \theta + \beta \rho \cos \theta \rho^2 \sin^2 \theta \\ &= \beta \rho^3 \sin \theta \cos^2 \theta + \beta \rho^3 \cos \theta \sin^2 \theta \\ \\ &= \frac{\beta}{2} \rho^3 \sin \theta + \frac{\beta}{2} \rho^3 \cos \theta + \frac{\beta}{2} \rho^3 \sin \theta (1 - 2 \sin^2 \theta) - \frac{\beta}{2} \rho^3 \cos \theta (2 \cos^2 \theta - 1) \\ \\ &= \beta \rho^3 \sin \theta + \beta \rho^3 \cos \theta - \beta \rho^3 \sin^3 \theta - \beta \rho^3 \cos^3 \theta \\ \\ &= \beta \rho^3 \sin \theta + \beta \rho^3 \cos \theta - \beta \rho^3 \frac{(3 \sin \theta - \sin 3\theta)}{4} - \beta \rho^3 \frac{(3 \cos \theta + \cos 3\theta)}{4} \end{aligned} \tag{4.13}$$

4.3 Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

si se usa la condición de $\beta = -3\alpha$ que Preza et al. proponen, la ecuación 4.13 queda como sigue,

$$\begin{aligned} &= \beta\rho^3 \sin \theta + \beta\rho^3 \cos \theta - \beta\rho^3 \frac{(3 \sin \theta - \sin 3\theta)}{4} - \beta\rho^3 \frac{(3 \cos \theta + \cos 3\theta)}{4} \\ &= -3\alpha\rho^3 \sin \theta - 3\alpha\rho^3 \cos \theta + \frac{9}{4}\alpha\rho^3 \sin \theta - \frac{3}{4}\alpha\rho^3 \sin 3\theta + \frac{9}{4}\alpha\rho^3 \cos \theta + \frac{3}{4}\alpha\rho^3 \cos 3\theta \\ &= -\frac{3}{4}\alpha\rho^3 \sin \theta - \frac{3}{4}\alpha\rho^3 \cos \theta - \frac{3}{4}\alpha\rho^3 \sin 3\theta + \frac{3}{4}\alpha\rho^3 \cos 3\theta \end{aligned} \tag{4.14}$$

se suman todos los términos para encontrar una expresión reducida

$$\begin{aligned} &= \alpha\frac{3}{4}\rho^3 \sin \theta + \alpha\frac{3}{4}\rho^3 \cos \theta + \alpha\frac{1}{4}\rho^3 \cos 3\theta - \alpha\frac{1}{4}\rho^3 \sin 3\theta \\ &+ \\ &= -\alpha\frac{3}{4}\rho^3 \sin \theta - \alpha\frac{3}{4}\rho^3 \cos \theta + \alpha\frac{3}{4}\rho^3 \cos 3\theta - \alpha\frac{3}{4}\rho^3 \sin 3\theta \end{aligned} \tag{4.15}$$

4.3 Modificación de la función de pupila con un espejo deformable.

finalmente se puede expresar la ecuación 4.10 en polinomios de Zernike como sigue,

$$\alpha (x^3 + y^3) - 3\alpha (x^2y + xy^2) = \alpha\rho^3 \cos 3\theta - \alpha\rho^3 \sin 3\theta \quad (4.16)$$

La ecuación 4.10 solo se expresa como la suma de 2 polinomios de Zernike que corresponden a las aberraciones de trifoil. Finalmente esta es la expresión que se usa para configurar el espejo deformable.

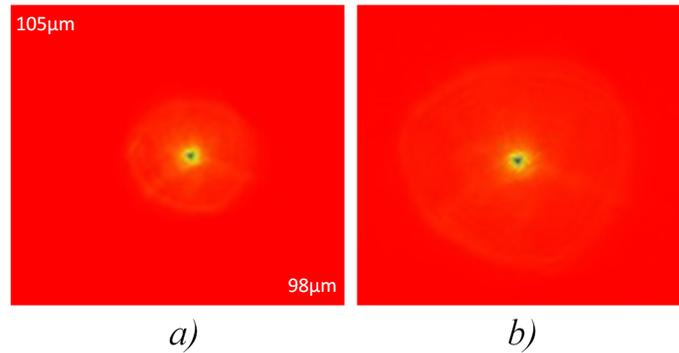


Figura 4.11: IQPSF's usando placa de fase cúbica generalizada con dos parámetros de α . En a) Una IQPSF con $\alpha = 10\mu m$. En b) una IQPSF con $\alpha = 20\mu m$.

De la misma manera que en la sección anterior, la figura 4.11 representa la IQPSF con un PV de $10\mu m$ y $20\mu m$ respectivamente.

4.3.3. Modificación de la pupila usando una placa de fase de la superposición de cuatro polinomios de Zernike

La placa de fase de la superposición de los 4 polinomios de Zernike [40] es la que se describió en el Capítulo 3 particularmente en la ecuación 3.8, esta ecuación es la que se codificó en el espejo deformable. La siguiente figura muestra sus respuestas en intensidad.

En 4.12 se muestran las respuestas a una fuente cuasi-puntual con un PV de $10\mu m$ y $20\mu m$ respectivamente. Es interesante mencionar que no se codificó el

4.4 Respuestas en intensidad a la fuente cuasi-puntual en 3D

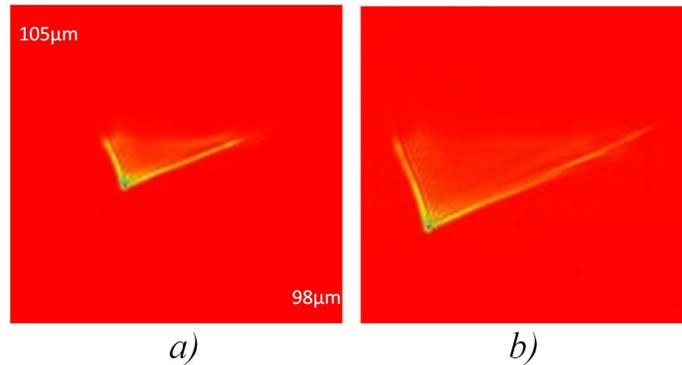


Figura 4.12: IQPSF's usando placa de fase de la superposición de 4 polinomios de Zernike con dos parámetros de α . En a) Una IQPSF con $\alpha = 10\mu m$. En b) una IQPSF con $\alpha = 20\mu m$.

filtro apodizante, ni tampoco se fabricó para usarlo en el experimento debido a que la estancia que se hizo para realizar el experimento fue muy corta.

4.4. Respuestas en intensidad a la fuente cuasi-puntual en 3D

Una manera interesante de saber la extensión del campo es la técnica que introdujo Ojeda et al. [41], usando herramientas matemáticas de espacio-fase y en coordenadas polares, donde se muestra un mapa de contornos que está en función de la OTF y el coeficiente de aberración de desenfoque, W_{20} ; en este diagrama se muestran todas las OTF's desenfocadas y es posible conocer si el sistema óptico es adecuado para extender el campo.

Sin embargo, otra manera de observar la profundidad de campo es en coordenadas rectangulares, se calcula y se observa directamente las respuestas a la QPS en 3D, por ejemplo, para este sistema formador de imágenes se obtiene una respuesta en intensidad para un objeto que está en foco, después se va desenfocando y se captura otra imagen, un esquema para explicar este experimento es el que se muestra en la figura 4.13.

4.4 Respuestas en intensidad a la fuente cuasi-puntual en 3D

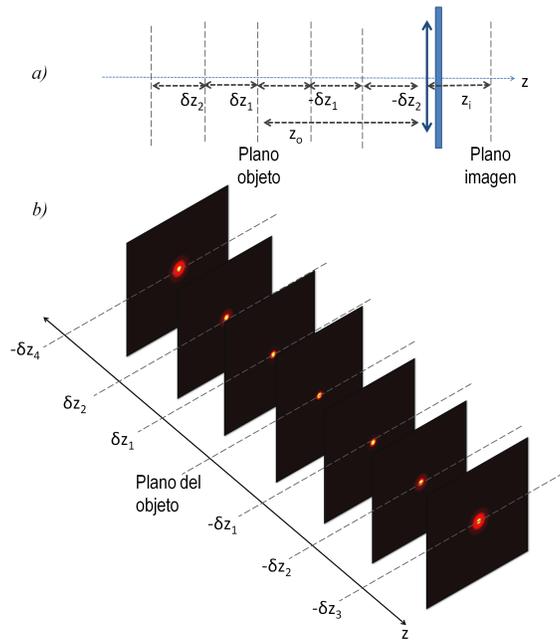


Figura 4.13: Esquema del experimento para encontrar las IQPSF's en 3D. En a) se muestra un esquema en 1D de las posiciones en las que se va ir moviendo el objeto y en b) un ejemplo de las imágenes que se van obteniendo y se van apilando para formar una imagen en 3D.

Entonces, primero se configura el espejo deformable ya sea usando la codificación para un espejo plano ó codificando alguna placa de fase; en la figura 4.13.a) se muestra el esquema de las posiciones donde se coloca el objeto (microesfera), la primera es cuando el sistema está conjugado, después se mueve el objeto digamos una distancia de δz_1 que experimentalmente corresponde a un incremento de 2μ y se captura como lo ejemplificaría el esquema de la figura 4.13.b), después se vuelve a mover el objeto con el incremento de $2\mu m$ y se vuelve a capturar. Se caracterizó el sistema con una microesfera para una profundidad de campo de $200\mu m$ capturando 100 imágenes.

En la figura 4.14.a) se muestran las IQPSF's usando cada una de las configuraciones antes mencionadas y en 4.14.b) las IQPSF's en 3D [39]. Las respuestas en intensidad para las dos α se muestra en la figura 4.15. Este conjunto de imágenes en 3D, son indispensables para llevar a cabo el proceso de restauración digital. Olarte et al. demostraron que si la curvatura que se encuentra en el mapa de contornos de la IQPSF en 3D es plana, la

4.4 Respuestas en intensidad a la fuente cuasi-puntual en 3D

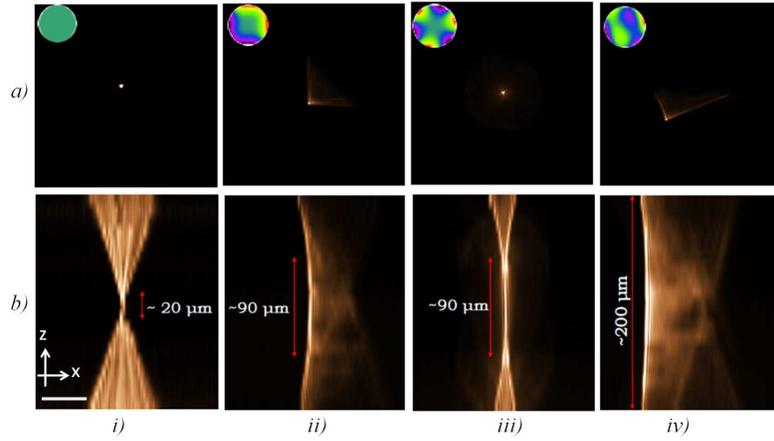


Figura 4.14: IQPSF's en 3D, la barra de escala es de $50\mu\text{m}$. En (a,i) se muestra la IQPSF libre de aberraciones, en (b,i) se muestra la correspondiente IQPSF en 3D; en (a,ii) la IQPSF usando la placa de fase cúbica, en (b,ii) la correspondiente IQPSF en 3D; en (a,iii) la IQPSF usando la placa de fase cúbica generalizada, en (b,iii) la correspondiente IQPSF en 3D; en (a,iv) la IQPSF usando la placa de fase propuesta en esta tesis, en (b,iv) la correspondiente IQPSF en 3D;.

profundidad de campo aumenta [42]. Se observa que la placa propuesta en el objetivo de esta tesis presenta mejor desempeño. Una vez obtenida esta caracterización, el siguiente paso es observar objetos en profundidad y verificar la información que se les pueda extraer a las IQPSFs en 3D.

4.5 Codificación de muestras biológicas

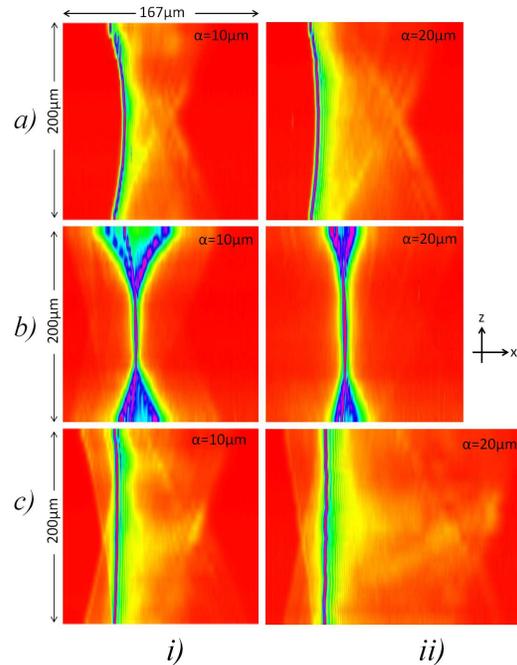


Figura 4.15: IQPSF's en 3D, en (a,i) muestra el mapa de contornos en para cuando se usa la placa de fase cúbica con un $\alpha = 10\mu m$, en (a,ii) el mapa de contornos cuando se usa la placa de fase cúbica para un $\alpha = 20\mu m$; (b,i) muestra el mapa de contornos en para cuando se usa la placa de fase cúbica generalizada con un $\alpha = 10\mu m$, en (b,ii) el mapa de contornos cuando se usa la placa de fase cúbica generalizada para un $\alpha = 20\mu m$; (c,i) muestra el mapa de contornos en para cuando se usa la placa de fase propuesta con un $\alpha = 10\mu m$, en (c,ii) el mapa de contornos cuando se usa la placa de fase propuesta para un $\alpha = 20\mu m$; .

4.5. Codificación de muestras biológicas

Tal como se ha explicado antes, la técnica de barrido digital de hoja de luz se vuelve un instrumento altamente poderoso en el estudio de muestras biológicas en profundidad. A continuación se presenta un conjunto de imágenes restauradas de los objetos que se usaron.

En 4.16.a) se utilizó un gusano *C. Elegans* codificado con un $\alpha = 10\mu m$, en 4.16.b) se utilizó un *C. Elegans* codificado con un PV de $\alpha = 20\mu m$, en 4.16.c) se utilizó una larva de mosca *Drosophila* con un $\alpha = 10\mu m$, en 4.16.d) se utilizó un embrión de mosca *Drosophila* con un $\alpha = 10\mu m$.

4.5 Codificación de muestras biológicas

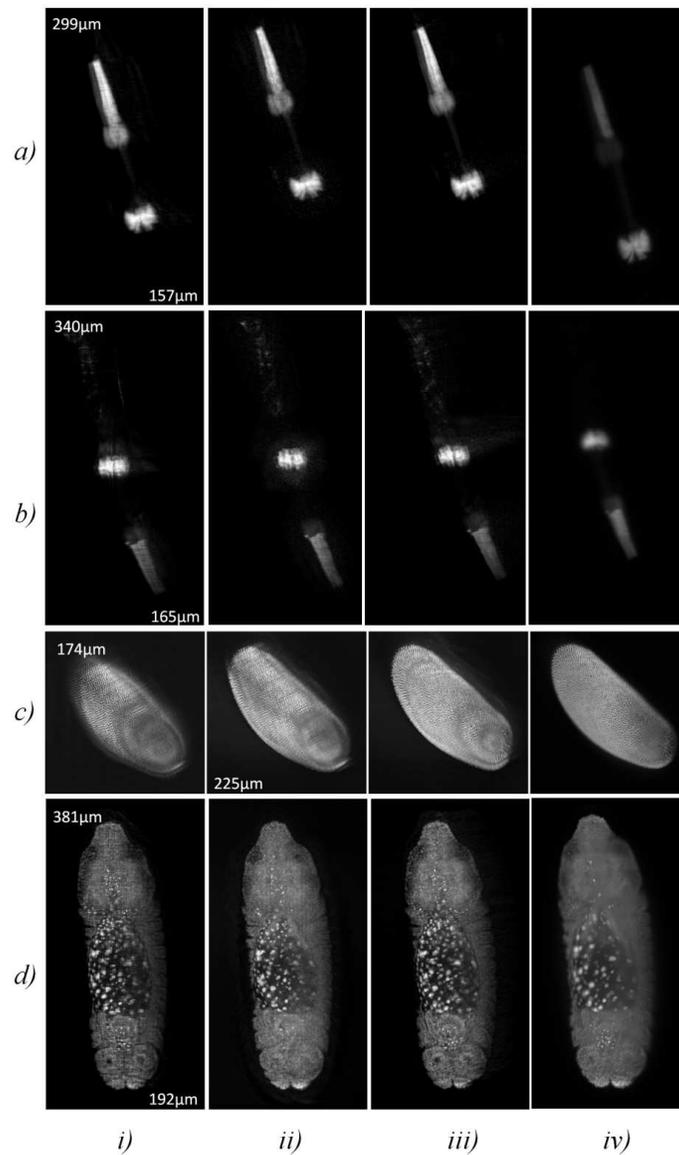


Figura 4.16: Restauración de muestras biológicas. a) y b) Faringe de *C. Elegans*. c) Larva de mosca y d) Embrión de mosca. Las codificaciones son: i) Cúbica pupila circular, ii) Cúbica generalizada, iii) Superposición de cuatro polinomios de Zernike y iv) sistema libre de aberraciones.

Cada una de estas muestras biológicas se codificaron usando las placas de fase que extienden la profundidad de campo. Las codificaciones corresponden de la siguiente manera: 4.16.i) codificación en la pupila usando la placa de

4.5 Codificación de muestras biológicas

fase cúbica, 4.16.ii) codificación de la pupila usando placa de fase cúbica generalizada, 4.16.iii) codificación de la pupila usando placa de fase propuesta y 4.16.iv) sistema libre de aberraciones [39, 38]. Podemos hacer ajustes de niveles de gris o simplemente hacer un tratamiento en el contraste para evitar las replicas que puedan aparecer en la restauración, aunque esta no es una solución viable; en el Capítulo 3 presentamos una solución al introducir un filtro apodizante en la función de pupila.

Se mostró que la técnica de hoja de luz combinada con la técnica de modificación de la función de pupila, donde se incluyen filtros de fase que extienden la profundidad de campo, hace que el sistema sea adecuado para analizar muestras biológicas vivas sin dañarlas. Aquí termina el trabajo experimental y se demostró previamente de manera teórico-numérico que la placa de fase propuesta cumple con la extensión de profundidad de campo. Esta placa de fase es aplicable usando algunos elementos de óptica adaptiva y es viable para el estudio de muestras biológicas.

Capítulo 5

Conclusiones

En este capítulo se presentan las conclusiones del trabajo de tesis. Se realizó un estudio teórico-numérico y experimental de la técnica de la modificación de la función de pupila, usando diferentes filtros de fase que extienden la profundidad de campo.

- Al evaluar numéricamente al filtro de fase cúbica usando objetos en profundidad, se detectó un desplazamiento lateral en las imágenes restauradas, lo cual representa una deficiencia de esta codificación.
- Se propuso una placa de fase cúbica que se le denominó placa modificada. Al evaluar su desempeño se observó que dio mejor resultado que la placa de fase cúbica anterior. No obstante, al revisar la literatura se encontraron los reportes de un par de filtros similares a la placa modificada. Sin embargo, la placa aquí propuesta tiene la ventaja de que introduce un solo parámetro de control, mientras que los otros dos introducen dos parámetros de control.
- Se propuso una nueva placa de fase usando la superposición de cuatro polinomios de Zernike y con un solo parámetro en el control de la des-

viación de la fase. Se evaluó su desempeño, tomando en cuenta objetos en profundidad y fuera del eje. Al observar las imágenes restauradas se encontraron elementos no deseados en el fondo de las mismas y esto se pudo resolver mediante la introducción de un filtro apodizador de perfil Gaussiano.

- Experimentalmente se probaron tres filtros de fase, dos de los aquí propuestos y uno tomado de la literatura. Teniendo como resultado la mejor eficiencia con uno de los aquí propuestos (superposición de cuatro polinomios de Zernike).
- Se aplicaron las técnicas de extensión de profundidad de campo en la observación de muestras biológicas, concretamente la mosca *Drosophila* y al gusano *C. Elegans* reiterando la efectividad de uno de los filtros aquí propuestos.

Trabajo futuro El trabajo de tesis finalizó con la demostración experimental con los filtros aquí propuestos. Sin embargo, otras tareas que pueden derivarse del trabajo aquí presentado son:

- a) Verificar la calidad de las imágenes cuando se introduce un filtro apodizador, como el Gaussiano mencionado en la tesis.
- b) El diseño de otros filtros de fase para compensar otras aberraciones presentes en los sistemas formadores de imágenes.

Bibliografía

- [1] Edward R. Dowski Jr and W. Thomas Cathey. Extended depth of field through wave-front coding. *Applied Optics*, 34(11):1859–1866, April 1995.
- [2] H. H. Hopkins. The frequency-response of a defocused optical system. *Proceedings of the Royal Society A*, 231, 1955.
- [3] W. T. Welford. Use of annular apertures to increase focal depth. *J. Opt. Soc. Am.*, (50):749, 1960.
- [4] M. Mino and Y. Okano. Improvement in the OTF of a defocused optical system through the use of shade apertures. *Applied Optics*, pages 2219–2225, January 1971.
- [5] J. S. Courtney-Pratt and R. L. Gregory. Microscope with enhanced depth of field and 3-D capability. *Applied Optics*, 12(10):2509–2519, 1973.
- [6] D. K. Hamilton C. J. R. Sheppard-Pratt and I. J. Cox. Optical microscopy with extended depth of field. *Proc. R. Soc. Lond. A*, (387):171–186, 1983.
- [7] James C. Wyant. *Basic Wavefront Aberration Theory for Optical Metrology*. Optical Science Center, University of Arizona, 1992.
- [8] Born Max and Emily Wolf. *Principles of Optics* *Principles of Optics*. Pergamon Press, 1980.

BIBLIOGRAFÍA

- [9] Jorge Ojeda-Castaneda, L.R. Berriel-Valdos, and Emma Montes. Spatial filter for increasing the depth of focus. *Optics Letters*, 10(11):520–522, 1985.
- [10] P. Andres Jorge Ojeda-Castaneda and A. Diaz. Objects that exhibit high focal depth. *Optics Letters*, 11(5):267–269, May 1986.
- [11] Jorge Ojeda-Castaneda and L.R. Berriel-Valdos. Arbitrarily high focal depth with finite apertures. *Optics Letters*, 13(3):183–185, 1988.
- [12] E. Tepichin Jorge Ojeda-Castaneda and A. Diaz. Arbitrarily high focal depth with a quasioptimum real and positive transmittance apodizer. *Applied Optics*, 28(13):183–185, 1989.
- [13] Edward R.Dowski Jr and W. Thomas Cathey. USA patent no. 7218448 extended depth of field optical system.
- [14] Sara Bradbum, Wade Thomas Cathey, and Edward R. Dowsky Jr. Realizations of focus invariance in optical-digital system with wave-front coding. *Applied Optics*, 36(35):9157–9166, December 1997.
- [15] Sudhakar Prasad, Todd C. Torgersen, V. Paul Pauca, and Robert J. Plemmon. Integrated optics system for image quality control. September 2002.
- [16] S. Prasad, T.C. Torgensen, V.P. Pauca, R.J. Plemmons, and J. van der Gracht. Engineering the pupil phase to improve image quality. volume 5108, pages 1–12, April 2003.
- [17] Albertina Castro and Jorge Ojeda-Castaneda. Asymmetric phase masks for extended depth of field. *Applied Optics*, 43(17):3474–3479, June 2010.
- [18] Angel Saucedo and Jorge Ojeda-Castaneda. High focal depth with fractional-power wave fronts. *Optics Letters*, 29(6):560–562, March 2004.
- [19] Nicolas Caron and Yunlong Sheng. Polynomial phase masks for extending the depth of field of a microscope. *Applied Optics*, 47(22):E39–E43, August 2008.

BIBLIOGRAFÍA

- [20] S. Prasad, V. P. Pauca, R. J. Plemmons, T. C. Torgersen, and J. van der Gracht. Pupil-phase optimization for extended-focus, aberration-corrected imaging system. volume 5559, pages 335–345, 2004.
- [21] Shuai Yuan and Chrysanthe Preza. Point-spread function engineering to reduce the impact of spherical aberration on 3D computational fluorescence microscopy imaging. *Optics Express*, 19(23):23298–23314, November 2011.
- [22] Roger Easton. *Basic Principle of Image Science II*. Rochester Institute of Technology, 2005.
- [23] Joseph W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. Stanford University, United States of America, McGraw Hill companies INC, 1996.
- [24] Eugene Hecht. *Optica*. Adelphy University, Madrid, Addison Wesley Iberoamericana S. A, 2000.
- [25] H. H. Hopkins. *Wave theory of Aberrations*. Oxford University press, Oxford, 1950.
- [26] Omar Palillero-Sandoval, J. Félix Aguilar, and L. R. Berriel-Valdos. Numerical study of the performance of a cubic phase plate in the microscope using the Quasi-point source concept, March 2013.
- [27] Jorge Ojeda-Castaneda, L.R. Berriel-Valdos, and Emma Montes. Ambiguity function as a design tool for high focal depth. *Applied Optics*, 27(4):790–795, February 1988.
- [28] W. Weinstein. Image of incoherent illuminate bright and opaque disks. *Journal of the Optical Society of America*, 45(12):1006–1008, December 1955.
- [29] Herbert Gross, W. Singer, and M. Totzek. 2005.
- [30] I. J. Orlando Guerrero, J. Félix Aguilar, L. R. Berriel Valdos, and J. E. A. Landgrave. Wigner Distribution function of the images of quasi-point source in the vicinity of the focal plane. volume 992, pages 1106–1110, 2008.

BIBLIOGRAFÍA

- [31] Sergio Mejía-Romero, L. R. Berriel-Valdos, J. Félix Aguilar, I. J. Orlando Guerrero, and J. E. A. Landgrave. Discrete Wigner distribution function applied on image of quasi-point source objects in coherent illumination. volume 8011, pages 801183–1 – 801183–8, November 2011.
- [32] Rafael C. González and Richard E. [Woods]. Prentice Hall, second edition edition, 2002.
- [33] Kenneth R. Castelman. Prentice Hall, 1996.
- [34] V. N. Mahajan. *Optical shop testing, Zernike polynomials wavefront fitting*. Wiley, 2007.
- [35] Jan Huisken and Didier Y. R. Stainier. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, (136):1963–1975, 2009.
- [36] James B. Pawley. *HANDBOOK OF BIOLOGICAL CONFOCAL MICROSCOPY*. Springer, 2006.
- [37] Jonathan A. Palero Emilio J. Gualda David Artigas Jürgen Mayer Jim Swoger James Sharpe Israel Rocha-Mendoza Raul Rangel-Rojo Omar E. Olarte, Jacob Licea-Rodriguez and Pablo Loza-Alvarez. Image formation by linear and nonlinear digital scanned light-sheet fluorescence microscopy with Gaussian and Bessel beam profiles. *Biomedical Optics Express*, 3(7):1492–1505, 2012.
- [38] Omar Palillero-Sandoval, Omar E. Olarte, Jordi Andilla, David Artigas, L. R. Berriel-Valdos, J. Félix Aguilar and Pablo Loza-Alvarez. Phase masks for extended-depth-of-field light-sheet microscopy, September 2014.
- [39] Omar E. Olarte, Omar Palillero-Sandoval, Jordi Andilla, David Artigas, L. R. Berriel-Valdos, J. Félix Aguilar and Pablo Loza-Alvarez. A wavefront-coding light-sheet microscope for biological imaging, September 2014.
- [40] Omar Palillero-Sandoval, J. Félix Aguilar, and L. R. Berriel-Valdos. Phase mask coded with the superposition of four Zernike polynomials

BIBLIOGRAFÍA

- for extending the depth of field in an imaging system. *Applied Optics*, 53(18):4033–4038, 2014.
- [41] K. H. Brenner, A. W. Lohmann, and J. Ojeda-Castaneda. The ambiguity function as a polar display of the OTF. *Optics Communications*, 44(5):323–326, February 1983.
- [42] Olarte. Omar E. Development of novel imaging tools for selected biomedical applications, 2014.