



INAOE

**Imagenología cuantitativa de fase para objetos
biológicos: Simulaciones numéricas**

Presenta

Ing. Tania Beatriz Martínez Hernández

Tesis sometida como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en la especialidad de Óptica

En el

Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica

Enero del 2023

Santa María Tonantzintla, Puebla

Asesora

Dra. Rosario Porras Aguilar

Co-Asesor

Dr. Julián David Sánchez De La Llave

©INAOE 2023

Derechos Reservados

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



RESUMEN

Muchos objetos de interés en las ramas de la biología, la medicina y las ingenierías son transparentes, es decir, presentan una absorción muy pequeña o nula, pero generan variaciones espaciales en la fase de la luz que los ilumina. Dichas variaciones de fase se pueden observar a través de diferentes técnicas incluyendo interferometría convencional, sin embargo, requiere ambientes libres de vibraciones mecánicas. Otro enfoque conocido como imagenología de fase cuantitativa ofrece mediciones de fase en un sistema robusto que puede implementarse en ambientes demandantes como biológicos e industriales. Las variaciones inducidas en la fase del campo iluminante se relacionan con propiedades físicas y químicas del objeto bajo observación, por lo que su determinación cuantitativa es de mucha utilidad. En este trabajo se presentan simulaciones numéricas de la visualización cuantitativa de objetos transparentes a través de los métodos de camino común y desplazamiento de fase, así como una comparación entre los resultados obtenidos.

ABSTRACT

Many objects of interest in the fields of biology, medicine and engineering are transparent, that is, they present little or no absorption, but they generate spatial variations in the phase of the light that illuminates them. These phase variations can be observed through different techniques including conventional interferometry; however, it requires environments free of mechanical vibrations. Another approach known as quantitative phase imaging offers phase measurements in a robust system that can be deployed in demanding environments such as biological and industrial. The variations induced in the phase of the illuminating field are related to physical and chemical properties of the object under observation, so their quantitative determination is very useful. In this work, numerical simulations of the quantitative visualization of transparent objects through the common path and phase shift methods are presented, as well as a comparison between the results obtained.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por iluminarme siempre que lo necesité.

Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) por la oportunidad de continuar mis estudios de posgrado y poder superarme.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico y la oportunidad de seguir mi camino de investigadora.

A mis asesores el Dr. David Sanches de la Llave y la Dra. Rosario Porras Aguilar, por brindarme su apoyo, conocimientos y sobre todo por ser dedicados y pacientes.

A mis sinodales Dr. Ulises , Dr. Felix y Dr. Carlos Treviño, por tomarse el tiempo de leer mi trabajo y hacer observaciones.

A Guillermo, Javier y Carla, por estar todo momento que les he necesitado, los quiero mucho amigos.

A todos mis compañeros y amigos de la maestría.

A todos los profesores que me dieron clases, por hacer el mayor esfuerzo al transmitir sus conocimientos.

DEDICATORIA

A la mujer que me enseñó de niño lo que vale el cariño exquisito, profundo y verdadero; a mi madre Mirna Hernández Pérez, por ser la mujer que más admiro y por seguir siendo mi gran ejemplo a seguir.

A mi padre Damián Martínez Gómez por hacerme ver mis opciones, alentarme a tomar las mejores decisiones y ser el apoyo que sé que nunca me va a faltar.

A mi hermana Karen Vianney Martínez Hernández, porque eres mi mejor amiga y nunca dejarme sola.

A mi hermano Damián Emir Martínez Hernández, por ser mi bebé, el que me inspira a ser un buen ejemplo.

A mi abuela Teresa Gómez Aguilar por estar pendiente y presente en mi vida.

A Rodrigo Adrián González Cruz por todo su amor y paciencia.

A mis primos Leny, Ángel, Pato, Naomi, Joseline, Tany, Idar, Derick, y Scarleth; Antonio, Janetzy, Héctor, Alberto, Fernando, Aylín, Daniela, Ana y Jimena por ser parte importante de mi vida.

A mis sobrinos: Gael, Joice, Ángel, Dante, Mady, Dylan, Dimitri, Silvia; Frida, Azul, Amy, Xavier y Emily. Porque los amo muchísimo y espero ser un ejemplo para ellos.

Y a toda mi familia.

ÍNDICE	
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA	5
CAPÍTULO 1.....	8
INTRODUCCIÓN	8
1.1 OBJETIVO GENERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	13
2.1 ECUACIONES DE MAXWELL.....	13
2.2 ECUACIÓN DE HELMHOLTZ	14
2.3 ANÁLISIS DE FOURIER.....	15
2.4 DIFRACCIÓN ESCALAR (ESPECTRO ANGULAR).....	16
2.5 FUNCION DE TRANSFERENCIA Y APROXIMACIÓN DE FRESNEL...	19
2.6 TRASFORMADA DE FOURIER CON UNALENTE	24
2.7 INTERFERENCIA	27
2.7.1 CLASIFICACIÓN GENERAL DE INTERFEROMETROS.....	30
2.7.2 DIVISIÓN DE AMPLITUD	30
2.7.3 TRAYECTORIA COMÚN	31
2.8 TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE FASE CUANTITATIVO	32
2.8.1 INTERFEROMETRÍA DE DESPLAZAMIENTO DE FASE	32
2.8.2 CONTRASTE DE FASE.....	34
2.9 IMAGENOLÓGÍA DE FASE CUANTITATIVA.....	36

2.9.1 TÉCNICAS QPI.....	37
2.9.1.1 FUERA DEL EJE	40
2.9.1.2 DESPLAZAMIENTO DE FASE	41
2.9.1.3 CAMINO COMÚN	42
2.9.1.4 MÉTODOS DE LUZ BLANCA.....	43
CAPÍTULO 3. DESPLAZAMIENTO DE FASE	45
3.1 MICROSCOPIA DE INTERFERENCIA REGISTRADA DIGITALMENTE CON DESPLAZAMIENTO DE FASE AUTOMÁTICO (DRIMAPS).....	45
3.2 MICROSCOPIA DE CUADRATURA ÓPTICA (OQM)	48
CAPÍTULO 4. CAMINO COMÚN	49
4.1 MICROSCOPIA DE FASE DE FOURIER (FPM)	49
4.2 MICROSCOPIA DE FASE DE DIFRACCIÓN (DPM).....	52
CAPÍTULO 5. ALGORITMOS NÚMERICOS.	54
CAPÍTULO 6. RESULTADOS.....	58
6.1 MÁXIMA FASE DEL OBJETO (GAUSS).	58
6.2 TAMAÑO DEL FILTRO EN EL MÉTODO FPM (GAUSS).....	61
6.3 MÁXIMA DE FASE DEL OBJETO (BINARIO).	63
6.4 EFECTO DE LA AMPLITUD Y FASE EN AMBOS MÉTODOS (GAUSS)	65
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.	67
LISTA DE FIGURAS	70
LISTA DE TABLAS	71
REFERENCIAS	72

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

La obtención de imágenes de células y de otros objetos transparentes se torna difícil ya que algunos detectores, incluida la retina humana, son sensibles a la intensidad de la luz, y debido a que la mayoría de las células no absorben ni dispersan la luz de manera significativa, las primeras imágenes de estas células carecían de contraste.

A finales del siglo XIX y principios del XX, los biólogos desarrollaron nuevos métodos para generar contraste artificial mediante la aplicación de químicos, colorantes y fluoróforos a las estructuras biológicas de interés. Hasta el día de hoy, la investigación microscópica de biopsias teñidas sigue siendo el estándar en patología, y la microscopía de fluorescencia se ha convertido en la herramienta de imagen más usada en biología celular (Popescu, 2017), estos mecanismos de contraste permiten a los investigadores etiquetar estructuras particulares de interés. Sin embargo, agregar sustancias químicas extrañas a una célula viva afectará su función. La luz de excitación de fluorescencia, a menudo en los rayos ultravioleta, ha demostrado ser tóxica para las células. Además, las moléculas de fluorescencia pueden sufrir fotoblanqueo: cambios químicos irreversibles que apagan la fluorescencia y limitan el intervalo de formación continua de imágenes a solo unos minutos (Chatterjee et al., 2010)

La imagenología de fase cuantitativa incorpora principios de interferometría y holografía, lo que permite visualizar el contraste sin necesidad de añadir químicos a las muestras, se enfoca en extraer los mapas de longitud de ruta óptica asociados con las muestras.

Regresando en la historia, la interferometría inició con el experimento de Thomas Young en 1803, que mostró que la luz, cuando pasa a través de

dos rendijas vecinas, produce franjas de interferencia, luego Albert Michelson perfeccionó un tipo de interferómetro que además de producir franjas espaciales, generó un interferograma temporal: franjas con respecto al tiempo de retardo entre las dos ondas que interfieren (Popescu Gabriel, 2011).

Algunos años más tarde la interferencia se entendió como un ingrediente crucial en la formación de imágenes en 1873, cuando Ernst Abbe publicó su revolucionaria teoría de la formación de imágenes coherentes. Después en la década de 1930, Frits Zernike inventó en los Países Bajos el microscopio de contraste de fase, comprobando lo que había expuesto Abbe (Malacara, 2015).

Aun así, la imagen de contraste de fase es un mapa de intensidad, aunque depende de la fase de una manera no trivial. Por ello, la microscopía de contraste de fase se ha utilizado en gran medida como una técnica de visualización más que como un método para inferir datos cuantitativos.

En la década de 1940, Dennis Gabor propuso el principio de la holografía; al capturar la fase de un campo con respecto a una referencia, se puede reconstruir el campo de imagen complejo sin distorsión, en esencia, se toma la transformada de Fourier de la señal original, se descartan los componentes de frecuencia negativa y luego se realiza una transformada inversa de Fourier. Por lo que, la fase está bien definida como el argumento de la señal analítica compleja, lo que permite registrar en un holograma no solo la amplitud del campo de luz sino también su fase (Gabor, 1948).

La imagen de fase cuantitativa lleva este principio más allá y extrae la fase del campo por separado de su amplitud. Ese desacoplamiento se logra mediante interferometría. La Figura 1, ilustra las dos clases de geometrías interferométricas en QPI: cambio de fase y fuera de eje.

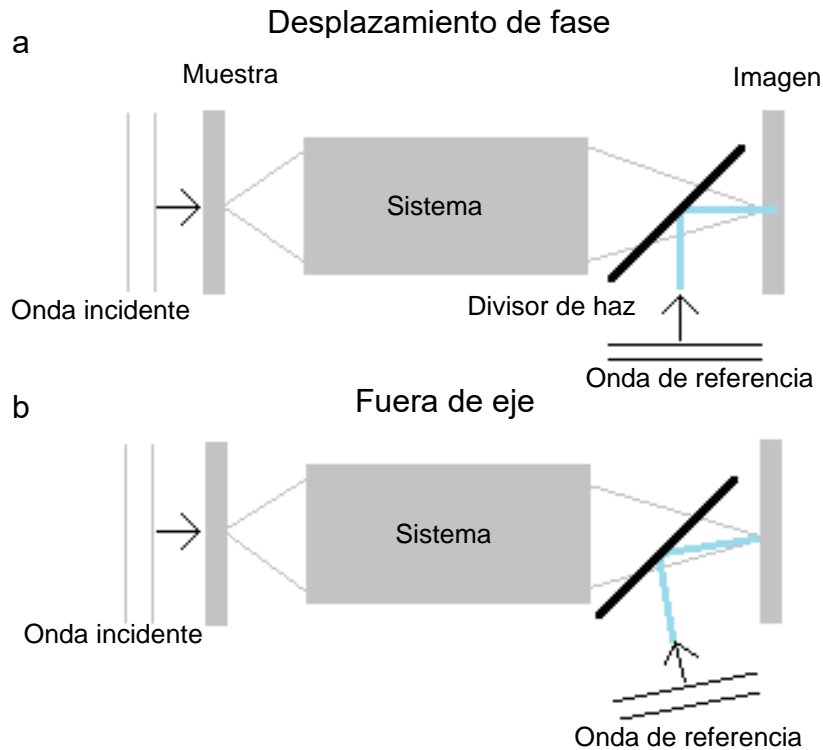


Figura 1. Ejemplos de configuraciones QPI. Imagen tomada de Popescu, 2017.

En la configuración de cambio de fase (figura 1a), el campo de referencia y el campo del objeto se propagan a lo largo del mismo eje. Normalmente, la fase del campo de referencia se desplaza de forma controlable en incrementos de $\pi/2$. Se adquieren cuatro imágenes de intensidad que corresponden a cuatro de estos cambios de fase para resolver cuatro incógnitas.

En la configuración de fuera del eje (figura 1b), el campo de referencia se inclina en cierto ángulo con respecto al campo del objeto, de modo que se crea un patrón de franjas en el plano de la imagen. El mapa de fase del campo de la imagen se extrae de una sola adquisición mediante el cálculo de la señal analítica compleja asociada con el interferograma real.

El rendimiento de un método QPI se evalúa en términos de muchos factores. Los más importantes son la resolución espacial (muestreo espacial),

la resolución temporal (muestreo temporal), la sensibilidad de fase espacial y la sensibilidad de fase temporal.

La resolución espacial establece los detalles más finos en el plano transversal de la muestra que el método puede generar. Idealmente, la resolución espacial se aproxima a su mejor valor limitado por difracción. La resolución temporal viene dada por la máxima tasa de adquisición que proporciona el instrumento, y establece el fenómeno dinámico más rápido que se puede estudiar.

La sensibilidad de fase espacial describe el cambio de fase más pequeño detectable en el campo de visión en un instante de tiempo. El ruido espacial se ve afectado por las propiedades de coherencia de la iluminación. Por ejemplo, la iluminación láser genera patrones de motas, lo que da como resultado un fondo ruidoso y, por lo tanto, reduce la sensibilidad espacial. La iluminación de luz blanca, por otro lado, promedia las motas y genera un fondo más uniforme y un bajo ruido espacial.

La sensibilidad de fase temporal establece el cambio de fase detectable más pequeño a lo largo del eje del tiempo en un punto fijo en el espacio. Está relacionado con la estabilidad del interferómetro y es muy importante cuando se estudian fenómenos dinámicos sutiles que dan como resultado pequeños desplazamientos. La forma más efectiva de minimizar el ruido temporal es diseñar un interferómetro en el que las dos ondas de interferencia atraviesen una trayectoria física casi idéntica (Park et al., 2018; Popescu, 2011, 2017)

QPI se ha convertido en una herramienta valiosa en los estudios biomédicos en virtud de sus capacidades distintivas de obtención de imágenes para obtener la distribución espacial del grosor óptico de las células vivas sin usar agentes de contraste o tinción específica, a diferencia de los microscopios tradicionales que usan un haz de luz para obtener imágenes, los instrumentos QPI detectan la superposición o interferencia de dos haces: un haz de objeto

que interactúa con la muestra y un haz de referencia que no lo hace (Lu et al., 2019).

El rápido progreso en el desarrollo de instrumentos durante los últimos años ha llevado a la comercialización de varios tipos de dispositivos QPI.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar una comparación entre los resultados de las simulaciones numéricas de los métodos de QPI: Microscopia Holográfica Digital (DHM) de dos haces y Microscopia de Fase de Fourier (FPM)

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudio de los diferentes métodos de Imagenología de fase cuantitativa (QPI).
- Desarrollo de los métodos de QPI (DHM y FPM) para su visualización mediante simulaciones numéricas.
- Obtención de las diferencias de fase con cada método para la comparación y discusión de los resultados con diferentes parámetros.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 ECUACIONES DE MAXWELL

Las ecuaciones de Maxwell explican la propagación y comportamiento de la luz en los medios, mediante la interrelación de vectores de campo eléctrico y magnético, las ecuaciones de Maxwell en el vacío son las siguientes:

$$\nabla \times \vec{E} = -\mu \frac{\partial \vec{B}}{\partial t}, \quad (1)$$

$$\nabla \times \vec{B} = \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}, \quad (2)$$

$$\nabla \cdot \varepsilon \vec{E} = 0, \quad (3)$$

$$\nabla \cdot \mu \vec{B} = 0, \quad (4)$$

donde μ es la permeabilidad magnética, ε es la permitividad eléctrica y los vectores \vec{E} y \vec{B} son el campo eléctrico y el campo magnético que contienen componentes rectilíneos respectivamente (Goodman, 2005).

Si el medio de propagación es lineal, isotrópico, homogéneo y no dispersivo, se puede aplicar el rotacional en ambos lados en la ecuación 1 (David J. Griffiths, 2013).

$$\begin{aligned} \nabla \times (\nabla \times \vec{E}) &= -\nabla \times \left(\mu \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right), \\ \nabla \times (\nabla \times \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E} &= -\mu \left(\frac{\partial}{\partial t} \right) (\nabla \times \vec{B}), \end{aligned} \quad (5)$$

$$-\nabla^2 \vec{E} = -\mu \varepsilon \left(\frac{\partial}{\partial t} \right) \left(\frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right),$$

$$\nabla^2 \vec{E} = \mu \varepsilon \left(\frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \right).$$

Al sustituir en la ecuación (5) que $c = 1/\sqrt{\mu \epsilon}$ (velocidad de la luz en el vacío), y para un campo escalar Ψ , obtenemos la ecuación de onda (Matveev, 1988):

$$\nabla^2 \Psi - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \Psi}{\partial t^2} = 0. \quad (6)$$

2.2 ECUACIÓN DE HELMHOLTZ

Para una onda monocromática, el campo escalar se puede escribir explícitamente como:

$$u(P, t) = A(P) \cos[2\pi\nu t - \phi(P)], \quad (7)$$

donde $A(P)$ y $\phi(P)$ son las amplitudes y la fase, respectivamente, de la onda en la posición P , mientras que ν es la frecuencia óptica, usando la notación compleja obtenemos:

$$u(P, t) = \text{Re}\{U(P)e^{-i2\pi\nu t}\}, \quad (8)$$

donde Re significa tomar la parte real y $U(P)$ se conoce como el fasor:

$$U(P) = A(P)e^{-i\phi(P)}. \quad (9)$$

La función compleja $U(P)$ sirve como descripción adecuada de la perturbación, ya que la dependencia del tiempo se conoce a priori. Si se sustituye la ecuación 8 en la 6, se consigue que U debe obedecer a la ecuación independiente del tiempo:

$$(\nabla^2 - k^2)U = 0, \quad (10)$$

donde k se determina como número de onda el cual está dado por:

$$k = 2\pi n \frac{\nu}{c} = \frac{2\pi}{\lambda},$$

y λ es la longitud de onda en el medio dieléctrico ($\lambda = c/n\nu$).

Esta relación se conoce como ecuación de Helmholtz, es decir cuando en la ecuación de onda se desprecia la parte temporal, ésta se transforma en una ecuación que solo depende de la parte espacial (Goodman, 2005).

2.3 ANÁLISIS DE FOURIER

La transformada de Fourier de una función g de dos variables independientes “ x ” e “ y ” se representa por $F(g)$ y está definida por (Gaskill, 1981):

$$F(g) = \iint_{-\infty}^{\infty} g(x, y) e^{-i2\pi(f_x x + f_y y)} dx dy. \quad (11)$$

La transformada así definida es en sí misma una función de valor complejo de dos variables independientes “ f_x ” y “ f_y ”, a las que generalmente nos referimos como frecuencias. De manera similar, la transformada inversa de Fourier de una función $G(f_x, f_y)$ será representada por:

$$F^{-1}(G) = \iint_{-\infty}^{\infty} G(f_x, f_y) e^{i2\pi(f_x x + f_y y)} df_x df_y. \quad (12)$$

De acuerdo con (Goodman, 2005) para que la transformada de Fourier sea realizable en un sentido matemático, $g(x, y)$ debe satisfacer ciertas condiciones suficientes. Estas condiciones se enumeran comúnmente como:

- (a) g debe ser absolutamente integrable en el rango infinito de x e y ;
- (b) g debe tener solo un número finito de discontinuidades; y
- (c) g no debe tener discontinuidades infinitas.

2.4 DIFRACCIÓN ESCALAR (ESPECTRO ANGULAR)

Consideremos un campo de onda U , incidente en un plano transversal (x, y) , viajando en la dirección z positiva. En el plano $z = 0$, el campo de ondas tiene un espectro angular:

$$A(f_x, f_y, 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y, 0) e^{(-i2\pi(f_x x + f_y y))} dx dy, \quad (13)$$

donde $U(x, y, 0)$ es el campo complejo. Esta transformada de Fourier es una descomposición de una función en un conjunto de funciones base en ondas planas, donde U se puede encontrar con la transformada inversa de su espectro.

$$U(x, y, 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} A(f_x, f_y, 0) e^{(i2\pi(f_x x + f_y y))} df_x df_y. \quad (14)$$

Para dar significado físico a las funciones en el integrando de la ecuación 14, tomemos en cuenta la onda plana representada en su forma compleja:

$$P(x, y, z; t) = e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - 2\pi\nu t)}, \quad (15)$$

donde $\vec{r} = x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}$ es el vector de posición y $\vec{k} = 2\pi/\lambda (\alpha\hat{x} + \beta\hat{y} + \gamma\hat{z})$ el vector de propagación de onda. Al quitar la dependencia del tiempo, la amplitud compleja de la onda en el plano z :

$$P(x, y, z) = e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r})} = e^{\frac{i2\pi}{\lambda}(\alpha x + \beta y)} e^{\frac{i2\pi}{\lambda} \gamma z}. \quad (16)$$

Considerando los cosenos directores α, β, γ relacionados por $\gamma = \sqrt{1 - \alpha^2 - \beta^2}$ y el plano $z=0$, la función exponencial compleja en la ecuación 14: $e^{(i2\pi(f_x x + f_y y))}$, también se puede describir como una onda plana que se propaga con cosenos directores:

$$\alpha = \lambda f_x; \quad \beta = \lambda f_y; \quad \gamma = \sqrt{1 - \lambda^2 f_x^2 - \lambda^2 f_y^2}. \quad (17)$$

Entonces, el espectro angular del campo de ondas en $z = 0$ se puede escribir en términos de cosenos directores como:

$$A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0\right) = \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y, 0) e^{-i2\pi\left(\frac{\alpha}{\lambda}x + \frac{\beta}{\lambda}y\right)} dx dy. \quad (18)$$

La ecuación 18 es el espectro angular de la perturbación $U(x, y, 0)$

Considerando que el campo de onda ha recorrido una distancia z hasta un plano paralelo al plano (x, y) , el espectro angular del campo de ondas en este punto es:

$$A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right) = \iint_{-\infty}^{\infty} U(x, y, z) e^{-i2\pi\left(\frac{\alpha}{\lambda}x + \frac{\beta}{\lambda}y\right)} dx dy. \quad (19)$$

Como antes, podemos escribir el campo de ondas como una transformada de Fourier inversa de su espectro:

$$U(x, y, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right) e^{i2\pi\left(\frac{\alpha}{\lambda}x + \frac{\beta}{\lambda}y\right)} d\frac{\alpha}{\lambda} d\frac{\beta}{\lambda}. \quad (20)$$

Con ello se pretende encontrar la relación entre $A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0\right)$ y $A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right)$ y así se obtienen los efectos de la propagación de onda en el espectro angular.

Se puede escribir U como:

$$U(x, y, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right) e^{i2\pi\left(\frac{\alpha}{\lambda}x + \frac{\beta}{\lambda}y\right)} d\frac{\alpha}{\lambda} d\frac{\beta}{\lambda}. \quad (21)$$

El campo de ondas, U , debe satisfacer la ecuación de Helmholtz $[(\nabla^2 + k^2)U = 0]$ en todos los puntos sin fuentes, Entonces sustituimos U en la ecuación de Helmholtz.

$$\frac{d^2}{dz^2} A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right) + \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 [1 - \alpha^2 - \beta^2] A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right) = 0. \quad (22)$$

Una solución a esta ecuación se puede escribir en la forma:

$$A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right) = A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0\right) e^{i\frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{1-\alpha^2-\beta^2}z}. \quad (23)$$

Esta solución nos da dos posibles resultados, el primero $\alpha^2 + \beta^2 < 1$, el efecto de propagación sobre la distancia z es un cambio de las fases relativas de varios componentes del espectro angular. Como cada componente de onda plana se propaga con diferente ángulo, cada una viaja diferentes distancias entre los dos planos paralelos, y por lo tanto se introducen retardos de fase relativos.

Por otro lado, cuando $\alpha^2 + \beta^2 > 1$, la ecuación 23 se convierte en:

$$A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right) = A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0\right) e^{-\frac{z}{\lambda} \sqrt{\alpha^2 + \beta^2 - 1}}. \quad (24)$$

Esta es la solución que no se propaga, ya que decae a cero rápidamente. Estos componentes se denominan ondas evanescentes y, dado que podemos suponer que la distancia z es mayor que unas pocas longitudes de onda pueden descartarse (Goodman, 2005).

Entonces notamos que la perturbación observada en (x, y, z) se puede escribir en términos del espectro angular inicial transformando inversamente la ecuación 23, dando:

$$U(x, y, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}; 0\right) e^{i2\pi(1 - \alpha^2 - \beta^2)z} \times \\ \text{circ}\left(\sqrt{\alpha^2 + \beta^2}\right) e^{i2\pi\left(\frac{\alpha}{\lambda}x, \frac{\beta}{\lambda}y\right)} d\frac{\alpha}{\lambda} d\frac{\beta}{\lambda}, \quad (25)$$

donde la función circ limita la región de integración a la región dentro de: $\alpha^2 + \beta^2 < 1$. Tenga en cuenta que los componentes del espectro angular más allá del corte de onda evanescente contribuyen a $U(x, y, z)$. este hecho es la razón fundamental por la que ningún sistema de imagen convencional puede resolver una estructura periódica con un período más fino que la longitud de onda de la radiación utilizada. es posible, sin embargo, acoplarse a ondas evanescentes con estructuras muy finas situadas muy cerca del objeto difractante, y así recuperar información que de otro modo se perdería. (Goodman, 2005).

2.5 FUNCION DE TRANSFERENCIA y APROXIMACIÓN DE FRESNEL

Un sistema de imágenes es invariante en el espacio si la imagen de un objeto de fuente puntual cambia solo en ubicación, no en forma funcional, a medida que la fuente puntual explora el campo del objeto. El fenómeno de propagación actúa como un sistema lineal invariante en el espacio y se caracteriza por una función de transferencia relativamente simple.

La propiedad de invariancia espacial se demuestra más fácilmente al derivar una función de transferencia que describa los efectos de la propagación; si el mapeo tiene una función de transferencia, entonces debe ser invariante en el espacio. (Goodman, 2005).

Para encontrar la función de transferencia, volvemos al punto de vista del espectro angular. Sin embargo, en lugar de escribir los espectros angulares como funciones de los cosenos directores (α, β) , ahora es más conveniente dejar los espectros como funciones de frecuencias espaciales (fx, fy) . Las frecuencias espaciales y los cosenos directores están relacionados a través de la ecuación 17.

Sea el espectro espacial de $U(x, y, z)$ nuevamente representado por $A(fx, fy; z)$, mientras que el espectro de $U(x, y; 0)$ nuevamente se escribe $A(fx, fy; 0)$. Así podemos expresar $U(x, y, z)$ como:

$$U(x, y; z) = \iint_{-\infty}^{\infty} A(fx, fy; z) e^{i2\pi(f_x x + f_y y)} df_x df_y \quad (26)$$

Además de la ecuación 25:

$$U(x, y; z) = \iint_{-\infty}^{\infty} A(fx, fy; 0) \text{circ} \left(\sqrt{(\lambda fx)^2 + (\lambda fy)^2} \right) \times e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \left(\sqrt{1 - (\lambda fx)^2 - (\lambda fy)^2} z \right)} e^{i2\pi(f_x x + f_y y)} df_x df_y, \quad (27)$$

donde nuevamente hemos introducido explícitamente la limitación del ancho de banda asociada con las ondas evanescentes mediante el uso de una función circ. Una comparación de las dos ecuaciones anteriores muestra que:

$$A(f_x, f_y; z) = A(f_x, f_y; 0) \text{circ} \left(\sqrt{(\lambda f_x)^2 + (\lambda f_y)^2} \right) \times e^{\left[\frac{i2\pi}{\lambda} \left(\sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2} z \right) \right]}, \quad (28)$$

Finalmente, se ve que la función de transferencia del fenómeno de propagación de ondas es:

$$H(f_x, f_y) = \begin{cases} e^{i2\pi \frac{z}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2}} & \sqrt{f_x^2 - f_y^2} < 1/\lambda \\ 0 & \text{de lo contrario} \end{cases} \quad (29)$$

Por lo tanto, el fenómeno de propagación puede considerarse como un filtro espacial dispersivo lineal con un ancho de banda finito. La transmisión del filtro es cero fuera de una región circular de radio λ^{-1} en el plano de frecuencia. Dentro de ese ancho de banda circular, el módulo de la función de transferencia es la unidad, pero se introducen cambios de fase dependientes de la frecuencia. La dispersión de fase del sistema es más significativa a frecuencias espaciales altas y desaparece cuando f_x y f_y se aproximan a cero. Además, para cualquier par de frecuencias espaciales fijas, la dispersión de fase aumenta a medida que aumenta la distancia de propagación z . (Goodman, 2005).

Para comenzar con el principio de aproximaciones de Fresnel se presenta primero el principio de forma explícita para el caso de coordenadas rectangulares. En la figura 2 se muestra, se supone que la apertura de difracción se encuentra en el plano (ξ, η) y se ilumina en la dirección z positiva.

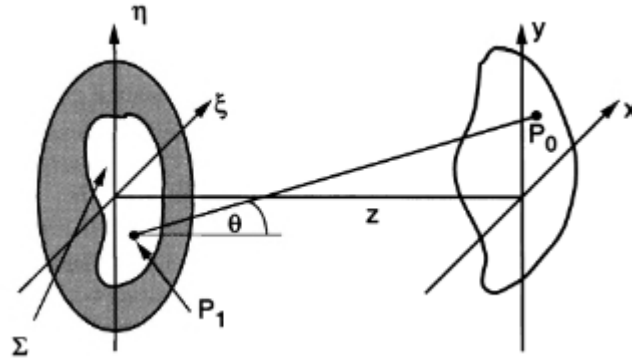


Figura 2. Geometría de difracción. Imagen tomada de Goodman, 2005.

Para el campo de ondas a través del plano (x, y) , que es paralelo al plano (ξ, η) y a una distancia normal z de él, el principio de Huygens-Fresnel se puede escribir como:

$$U(x, y) = z \frac{i}{\lambda} \iint_{\Sigma} U(\xi, \eta) \frac{\exp(ikr_{01})}{r_{01}^2} d\xi d\eta, \quad (30)$$

donde la distancia r_{01} se relaciona con θ de la siguiente forma: $r_{01} = \frac{\cos \theta}{z}$ y está dada exactamente por:

$$r_{01} = \sqrt{z^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2} \quad (31)$$

Pasando ahora a la aproximación de Fresnel, para una distancia r_{01} entre P_1 y P_0 . Las aproximaciones se basan en la expansión binomial de la raíz cuadrada en la ecuación 31. Sea b un número menor que la unidad y considere la expresión $\sqrt{1 + b}$. La expansión binomial de la raíz cuadrada está dada por

$$\sqrt{1 + b} = 1 + \frac{1}{2}b - \frac{1}{8}b^2 + \dots, \quad (32)$$

donde el número de términos necesarios para una precisión dada depende de la magnitud de b . Para aplicar la expansión binomial al problema en cuestión, factorice a z fuera de la expresión de r_{01} , lo que da como resultado

$$r_{01} = z \sqrt{1 + \left(\frac{x - \xi}{z}\right)^2 + \left(\frac{y - \eta}{z}\right)^2} \quad (33)$$

Sea la cantidad b en la ecuación 32 consta del segundo y tercer término bajo la raíz cuadrada en la ecuación 33. Entonces, conservando solo los dos primeros términos de la expansión de la ecuación 32, tenemos:

$$r_{01} \approx z \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{x-\xi}{z} \right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{y-\eta}{z} \right)^2 \right] \quad (34)$$

Ambos términos se mantienen debido a que los cambios de fase de tan solo una fracción de un radián pueden cambiar significativamente el valor de la exponencial. Por lo tanto, la expresión resultante para el campo en (x, y) se convierte en

$$U(x, y) = \frac{\exp(ikz)}{i\lambda z} \iint_{-\infty}^{\infty} U(\xi, \eta) \exp \left\{ i \frac{k}{2z} [(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2] \right\} d\xi d\eta, \quad (35)$$

donde hemos incorporado los límites finitos de la apertura en la definición de $U(\xi, \eta)$, de acuerdo con las condiciones de contorno habituales supuestas. La ecuación 35 es una convolución, expresable en la forma:

$$U(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} U(\xi, \eta) h(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta, \quad (36)$$

donde el kernel de convolución es:

$$h(x, y) = \frac{\exp(ikz)}{i\lambda z} \exp \left[\frac{ik}{2z} (x^2 + y^2) \right]. \quad (37)$$

Cuando esta aproximación es válida, se dice que el observador está en la región de difracción de Fresnel, o de manera equivalente en el campo cercano de la apertura. (Goodman, 2005).

Ahora veremos las aproximaciones de Fresnel desde el punto de vista del método de análisis del espectro angular, comenzando con la ecuación 29, que como ya vimos expresa la función de transferencia de la propagación a través del espacio libre, este resultado, que es válido sujeto solo a la aproximación escalar, ahora se puede comparar con la función de transferencia predicha por los resultados del análisis de Fresnel.

Fourier Transformando la respuesta al impulso de la difracción de Fresnel (ecuación 37), encontramos una función de transferencia válida para la difracción de Fresnel,

$$H(f_x, f_y) = F \left\{ \frac{\exp(ikz)}{i\lambda z} \exp \left[i \frac{\pi}{\lambda z} (x^2 + y^2) \right] \right\} = \exp(ikz) \exp[-i\pi\lambda z(f_x^2 + f_y^2)]. \quad (38)$$

Así, en la aproximación de Fresnel, la dispersión de fase espacial general que representa la propagación se reduce a una dispersión de fase cuadrática. El factor e^{ikz} a la derecha de esta ecuación representa un retraso de fase constante sufrido por todos los componentes de onda plana que viajan entre dos planos paralelos separados por una distancia normal z . El segundo término representa los diferentes retrasos de fase sufridos por componentes de onda plana que viajan en diferentes direcciones. (Goodman, 2005).

La expresión (38) es claramente una aproximación a la función de transferencia más general (29). Podemos obtener el resultado aproximado del resultado general aplicando una expansión binomial al exponente de (29),

$$\sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2} \approx 1 - \frac{(\lambda f_x)^2}{2} - \frac{(\lambda f_y)^2}{2} \quad (39)$$

Lo cual es válido siempre que $|\lambda f_x| \ll 1$ y $|\lambda f_y| \ll 1$. Tales restricciones en f_x y f_y son simplemente restricciones a ángulos pequeños. Entonces vemos que, desde la perspectiva del espectro angular, la aproximación de Fresnel es precisa siempre que solo estén involucrados pequeños ángulos de difracción. Es por esta razón que a menudo decimos que las aproximaciones de Fresnel y la aproximación paraxial son equivalentes. (Goodman, 2005).

2.6 TRASFORMADA DE FOURIER CON UNALENTE

La iluminación se supone monocromática, bajo esta condición, los sistemas estudiados son llamados sistemas “coherentes”, lo cual significa que son lineales en amplitud compleja.

Usando una lente delgada positiva se busca la distribución de la amplitud de la luz a lo largo de un plano detrás de ella. En algunos casos el plano de interés será el plano focal posterior de la lente, que por definición es un plano normal al eje de la lente y está situado una distancia focal atrás de la lente (en la dirección de propagación de la luz). La información a ser transformada se introduce en el sistema óptico a través de un aparato que tenga una transmitancia proporcional a la función de entrada de interés. En algunos casos este aparato puede ser una transparencia fotográfica, mientras que en otros puede ser un modulador espacial de luz no fotográfico, cuya transmitancia de amplitud es controlada por una señal externa eléctrica u óptica. En general nos referiremos a estos aparatos como transparencias de entrada. También nos referiremos a la entrada como el “objeto”. En el siguiente ejemplo se considera una onda plana de entrada.

Consideremos una transparencia de entrada con transmitancia de amplitud $t_A(x, y)$, como se muestra en la figura 3.

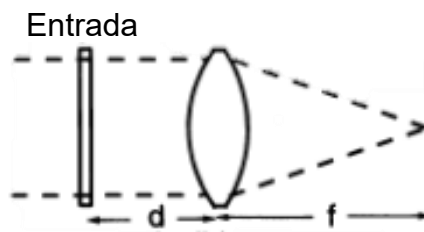


Figura 3. Geometría para realizar la operación de transformada de Fourier con lente positiva. Imagen tomada de Goodman, 2005.

La entrada es iluminada uniformemente por una onda plana monocromática de amplitud A con incidencia normal colocada a una distancia “ d ” en frente de la lente.

Primero analizamos el caso como si la entrada se encontrara justo frente a la lente donde la perturbación incidente en la lente es:

$$U_1(x, y) = At_A(x, y). \quad (40)$$

El tamaño finito de la lente puede ser representado asociando a la lente una función de pupila $P(x, y)$ que toma el valor de “1” dentro de la apertura de la lente y “0” en cualquier otro lado. Entonces, la distribución de amplitud atrás de la lente se puede escribir como:

$$U'_1(x, y) = U_1(x, y)P(x, y)e^{-i\frac{k}{2f}(x^2+y^2)}. \quad (41)$$

Para encontrar la distribución $U_f(u, v)$ en el plano focal posterior de la lente, utilizamos la integral de difracción de Fresnel haciendo $z = f$, sustituyendo $U(\varepsilon, \eta) = U'_1(\varepsilon, \eta)$ dentro de la integral:

$$U_f(u, v) = \frac{e^{i\frac{k}{2f}(u^2+v^2)}}{i\lambda f} \iint_{-\infty}^{\infty} U'_1(x, y)e^{i\frac{k}{2f}(x^2+y^2)}e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(xu+yv)} dx dy, \quad (42)$$

donde un factor de fase constante ha sido omitido. Sustituyendo U'_1 en la ecuación anterior, los factores de fase cuadrática dentro de la integral se cancelan, de manera que:

$$U_f(u, v) = \frac{e^{i\frac{k}{2f}(u^2+v^2)}}{i\lambda f} \iint_{-\infty}^{\infty} U_1(x, y)e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(xu+yv)} dx dy. \quad (43)$$

Notamos que la amplitud y la fase de la luz en las coordenadas (u, v) en el plano focal de la lente están determinadas por la amplitud y la fase de los componentes de Fourier de la entrada en las frecuencias:

$$(f_X = \frac{u}{\lambda f}, f_Y = \frac{v}{\lambda f}). \quad (44)$$

En este caso donde el objeto se encuentra a una distancia “d” antes de la lente, supongamos que $F_o(f_x, f_y)$ representa el espectro de Fourier de la luz transmitida por la transparencia de entrada y que $F_l(f_x, f_y)$ representa el espectro de Fourier de la luz incidente en la lente, esto es:

$$F_o(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{At_A\}, F_l(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{U_l\}. \quad (45)$$

Suponiendo que la aproximación de Fresnel o paraxial es válida para la distancia de propagación d , y recordando que la función de transferencia de la propagación de la luz en el espacio libre en el análisis de espectro angular está dada por la ecuación 38, entonces F_o y F_l están relacionadas a través de:

$$F_l(f_x, f_y) = F_o(f_x, f_y)e^{[-i\pi\lambda d(f_x^2 + f_y^2)]}, \quad (46)$$

donde se ha omitido la constante de retraso de fase.

Por el momento, no tomaremos en cuenta el tamaño finito de la lente. Entonces, la expresión para la distribución de campo en el plano focal de la lente está dado por

$$U_f(u, v) = \frac{e^{i\frac{k}{2f}(u^2 + v^2)}}{i\lambda f} F_l(f_x, f_y), \quad (47)$$

$$U_f(u, v) = \frac{e^{i\frac{k}{2f}(u^2 + v^2)}}{i\lambda f} F_o(f_x, f_y)e^{[-i\pi\lambda d(f_x^2 + f_y^2)]},$$

Factorizando:

$$U_f(u, v) = \frac{1}{i\lambda f} F_o(f_x, f_y)e^{i\frac{k}{2f}(u^2 + v^2)} e^{[-i\pi\lambda d(f_x^2 + f_y^2)]}$$

$$U_f(u, v) = \frac{1}{i\lambda f} F_o(f_x, f_y)e^{[i\frac{k}{2f}(u^2 + v^2) - i\frac{k d}{2f^2}(u^2 + v^2)]}$$

$$U_f(u, v) = \frac{1}{i\lambda f} F_o\left(\frac{u}{\lambda f}, \frac{v}{\lambda f}\right) e^{[i\frac{k}{2f}\left(1 - \frac{d}{f}\right)(u^2 + v^2)]}$$

o,

$$U_f(u, v) = \frac{e^{[i\frac{k}{2f}(1-\frac{d}{f})(u^2+v^2)]}}{i\lambda f} \mathcal{F}\{At_A\}, \quad (48)$$

$$U_f(u, v) = A \frac{e^{[i\frac{k}{2f}(1-\frac{d}{f})(u^2+v^2)]}}{i\lambda f} \iint_{-\infty}^{\infty} t_A(\varepsilon, \eta) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(\varepsilon u + \eta v)} d\varepsilon d\eta. \quad (49)$$

Entonces, la amplitud y la fase de la luz en las coordenadas espaciales (u, v) están nuevamente relacionadas con la amplitud y la fase del espectro de la entrada en las frecuencias $(\frac{u}{\lambda f}, \frac{v}{\lambda f})$.

Cuando la entrada se coloca en el plano focal frontal de la lente, la curvatura de fase desaparece, dejando una relación de transformada de Fourier exacta debido a que el factor de fase cuadrático que multiplica a la integral desaparece para el caso especial de $d=f$ (Goodman, 2005).

2.7 INTERFERENCIA

La Interferencia ocurre cuando dos ondas mutuamente coherentes se superponen en algún lugar del espacio. Para la condición en la que las ondas son mutuamente coherentes se necesita: que ambas ondas procedan de la misma fuente o que sean monocromáticas y ambas con la misma frecuencia.

El principio de superposición no se aplica a la intensidad óptica debido a que la intensidad de la suma de dos o más ondas no necesariamente es la suma de sus intensidades. El fenómeno de la interferencia no puede explicarse sobre la base de la óptica de rayos, ya que depende de la relación de fase entre las ondas superpuestas. (Saleh & Teich, 2007).

Consideramos 2 fuentes puntuales S1 y S2 que emiten ondas monocromáticas de la misma frecuencia en un medio homogéneo y con separación a mucho mayor que λ . Ubicando los puntos de observación P lo suficientemente lejos de las fuentes de modo que en P los frentes de onda sean planos. Entonces tenemos dos ondas linealmente polarizadas de la siguiente forma:

$$E_1(r, t) = E_{01} \cos(k_1 \cdot r - \omega t + \epsilon_1), \quad (50)$$

$$\text{y } E_2(r, t) = E_{02} \cos(k_2 \cdot r - \omega t + \epsilon_2). \quad (51)$$

La intensidad en P está dada por:

$$I = \epsilon v \langle E^2 \rangle_T,$$

donde $\langle E^2 \rangle_T$ es el promedio temporal de la magnitud de la intensidad del campo eléctrico al cuadrado, por ahora se omiten las constantes y E se expresa:

$$E^2 = (E_1 + E_2) \cdot (E_1 + E_2) = E_1^2 + E_2^2 + 2E_1 \cdot E_2. \quad (52)$$

Tomando el promedio el tiempo de los dos lados, la intensidad es:

$$I = I_1 + I_2 + I_{12}, \quad (53)$$

siempre que:

$$I_1 = \langle E_1^2 \rangle_T; I_2 = \langle E_2^2 \rangle_T \text{ y } I_{12} = 2\langle E_1 \cdot E_2 \rangle_T.$$

Esta última expresión es conocida como 'termino de interferencia', para este caso, tenemos:

$$E_1 \cdot E_2 = E_{01} \cdot E_{02} [\cos(k_1 \cdot r + \epsilon_1) \times \cos(\omega t) + \text{sen}(k_1 \cdot r + \epsilon_1) \text{sen}(\omega t)] \times [\cos(k_2 \cdot r + \epsilon_2) \cos(\omega t) + \text{sen}(k_2 \cdot r + \epsilon_2) \text{sen}(\omega t)]. \quad (54)$$

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

$$\langle f(t) \rangle_T = \frac{1}{T} \int_t^{t+T} f(t') dt'. \quad (55)$$

El periodo τ de las funciones armónicas es $2\pi/\omega$ y para este caso $T \gg \tau$ y el coeficiente $1/T$ frente a la integral tiene un efecto dominante. Al calcular el promedio de la ecuación 54, tenemos:

$$\langle E_1 \cdot E_2 \rangle_T = \frac{1}{2} E_{01} \cdot E_{02} \cos(k_1 \cdot r + \epsilon_1 - k_2 \cdot r - \epsilon_2), \quad (56)$$

por lo que el término de interferencia es:

$$I_{12} = E_{01} \cdot E_{02} \cos \delta, \quad (57)$$

donde δ es la diferencia de fase resultante de la combinación de una diferencia de longitud de camino y una diferencia de ángulo de desfase inicial. Si E_1 y E_2 son perpendiculares, $I_{12} = 0$ e $I = I_1 + I_2$.

La situación más común, donde E_{01} es paralela a E_{02} , en este caso, la intensidad se reduce a:

$$I_{12} = E_{01}E_{02} \cos \delta = 2\sqrt{I_1I_2} \cos \delta,$$

donde la intensidad total es:

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1I_2} \cos \delta. \quad (58)$$

En varios puntos del espacio, la intensidad puede ser mayor, menor o igual a $I_1 + I_2$ dependiendo del valor de δ . El máximo de intensidad se obtiene cuando $\cos \delta = 1$, de forma que:

$$I_{m\acute{a}x} = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1I_2}. \quad (59)$$

Cuando $\delta = 0, \pm 2\pi, \pm 4\pi, \dots$, se conoce como interferencia constructiva total. Por otro lado, la intensidad mínima se logra cuando las ondas están desfasadas 180° , es decir $\cos \delta = -1$, y la intensidad se describe:

$$I_{min} = I_1 + I_2 - 2\sqrt{I_1I_2}, \quad (60)$$

se produce cuando $\delta = \pm\pi, \pm 3\pi, \pm 5\pi, \dots$ y se denomina interferencia destructiva total. (Hecht, 2017)

Podemos clasificar los sistemas interferométricos en dos grupos: división del frente de onda y división de amplitud.

2.7.1 CLASIFICACIÓN GENERAL DE INTERFEROMETROS

Los interferómetros tienen muchas aplicaciones, es utilizada en múltiples ciencias y tecnologías, como astronomía, fibra óptica, metrología óptica, oceanografía, sismología, espectroscopia (y sus aplicaciones a la química), mecánica cuántica, física nuclear y física de partículas, física del plasma, entre otras.

Existen distintos tipos de interferómetros, los cuales podemos clasificar a grandes rasgos en dos tipos: división de amplitud y de trayectoria común; en el primero la idea general consiste en dividir un haz incidente en dos mediante orificios, rendijas, espejos u otros elementos ópticos y al final volver a reunirlos, en el segundo se pretende que el haz siga por el mismo camino hasta que suceda un retraso que afecte solo una parte del haz.

2.7.2 DIVISIÓN DE AMPLITUD

En este caso, la onda luminosa se secciona en dos segmentos que viajan por caminos distintos antes de recombinarse e interferir, al dividirse usando una placa de vidrio o un espejo semiplatedado, parte de la onda se transmite y la otra se refleja, y las amplitudes de la onda transmitida y la onda reflejada serán inferiores a la original, por lo que podemos decir que la onda se ha “dividido”. (Hecht, 2017).

En la figura 4 se ilustran dos ejemplos de interferómetros de división de amplitud importantes: el interferómetro de Mach Zehnder y el interferómetro de Michelson.

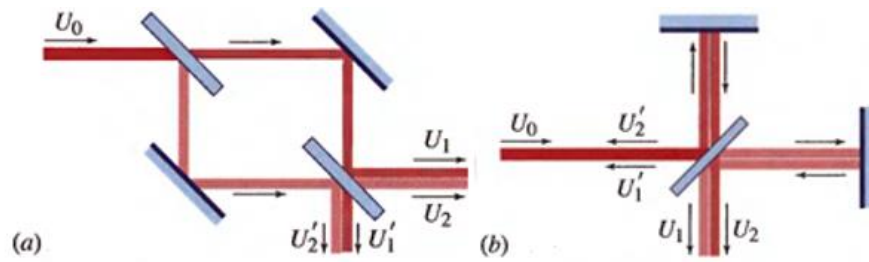


Figura 4. interferómetros a) Mach-Zehnder, b) Michelson. Imagen tomada de (Saleh & Teich, 2007)

Una onda A se divide en dos ondas U_1 y U_2 (se muestran con sombras claras y oscuras para facilitar la visualización, pero en realidad son congruentes). Después de viajar por diferentes caminos, las ondas se recombinan en una onda de superposición $U = U_1 + U_2$ cuya intensidad se registra. Las ondas se dividen y se recombinan usando divisores de haz (Saleh & Teich, 2007).

2.7.3 TRAYECTORIA COMÚN

En los interferómetros de división de amplitud de deben tomar las precauciones adecuadas para que el patrón de franjas en el plano de observación no sea inestable y las mediciones sean posibles. Estos problemas son particularmente agudos cuando se prueban sistemas ópticos de gran apertura (Popescu, 2011). La mayor parte de la dificultad puede evitarse utilizando los llamados interferómetros de camino (o trayectoria) común, en los que los haces de referencia y de prueba recorren el mismo camino general.

Estos interferómetros tienen la ventaja adicional de que no requieren componentes ópticos perfectos de dimensiones iguales a las del sistema bajo prueba para producir el haz de referencia. Además, la diferencia de trayectoria entre los dos haces en el centro del campo de visión es, en general, cero, lo que hace posible el uso de luz blanca.

En ciertos interferómetros de trayectoria común, el haz de referencia atraviesa una pequeña área del sistema óptico bajo prueba y, por lo tanto, no

se ve afectado por las aberraciones del sistema. Cuando este haz interfiere con el haz de prueba, que ha atravesado toda la apertura del sistema óptico, se obtiene información explícita sobre los defectos del sistema (Malacara & Mallick, 2007)

Como ejemplo de este tipo de interferómetros tenemos el interferómetro de Zernike de contraste de fase, el interferómetro de Burch, entre otros.

Para este trabajo vamos a usar dos interferómetros, uno de dos haces y otro de camino común, usando técnicas de imagenología de fase cuantitativa de lo cual hablaremos más adelante.

2.8 TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE FASE CUANTITATIVO

El uso de métodos interferométricos en la prueba de sistemas ópticos presenta importantes ventajas sobre otros procedimientos debido a naturaleza inequívoca de la información derivada de ellos y la naturaleza de auto calibración de la prueba. (Dyson, 1957)

2.8.1 INTERFEROMETRÍA DE DESPLAZAMIENTO DE FASE

La forma de las franjas de interferencia en un interferómetro de dos haces, por ejemplo, el de Fizeau o el de Twyman-Green, nos permite determinar la forma del frente de onda bajo prueba de modo cualitativo inmediatamente observando la forma de las franjas.

Por otro lado, una determinación cuantitativa no es tan fácil, la desviación del frente de onda a medir con respecto al frente de onda de referencia es la diferencia de camino óptico, la cual se puede conocer de manera relativa, es decir con respecto a otro punto del frente de onda, pero solamente sobre el centro de las franjas de interferencia. Para conocer las deformaciones sobre toda la extensión del frente de onda se hacen necesarias técnicas de interpolación, sacrificando así precisión. Para evitar estas pérdidas

se usa la técnica de interferometría de desplazamiento de fase donde es posible medir las deformaciones del frente de onda bajo prueba en cualquier punto de su apertura.

En la interferometría de desplazamiento de fase la diferencia de camino óptico, es decir, la diferencia de fase entre los dos frentes de onda se cambia a varios valores sucesivos en incrementos equidistantes en fase. De esta manera se producen no un interferograma, sino varios, cada uno con diferente valor de la diferencia de camino óptico. Consideremos un punto dado cualquiera del interferograma. La irradiancia $I(x, y)$ en ese punto (x, y) depende de la diferencia de fase de acuerdo con la relación:

$$I(x, y) = U_1^2(x, y) + U_2^2(x, y) + 2U_1U_2(x, y)\cos [\phi(x, y) + \alpha]. \quad (61)$$

Por medio de la técnica de interferometría de desplazamiento de fase es posible medir las deformaciones del frente de onda bajo prueba en cualquier punto de su apertura sin sacrificar precisión (Malacara, 2015).

En la interferometría de desplazamiento de fase la diferencia de camino óptico, es decir, la diferencia de fase entre los dos frentes de onda se cambia a varios valores sucesivos en incrementos equidistantes en fase, es decir varios interferogramas cada uno con diferente valor de la diferencia de camino óptico.

Si usamos el método de tres pasos (Creath, 1988), se necesita un mínimo de tres conjuntos de datos de franja registrados para reconstruir un frente de onda, la fase se puede calcular a partir de un cambio de fase de $\pi/2$ (90°) por exposición con ángulos de $\pi/4$, $3\pi/4$ y $5\pi/4$. Las tres medidas de intensidad pueden expresarse como:

$$I_1(x, y) = I_0(x, y) \left\{ 1 + \gamma \cos \left[\phi(x, y) + \frac{\pi}{4} \right] \right\}, \quad (62)$$

$$I_2(x, y) = I_0(x, y) \left\{ 1 + \gamma \cos \left[\phi(x, y) + \frac{3\pi}{4} \right] \right\}, \quad (63)$$

$$I_3(x, y) = I_0(x, y) \left\{ 1 + \gamma \cos \left[\phi(x, y) + \frac{5\pi}{4} \right] \right\}, \quad (64)$$

donde I_0 es la Intensidad, γ_0 es la modulación de las franjas de interferencia y ϕ es la fase de frente de onda, resolviendo el sistema de ecuaciones, tenemos:

$$\theta(x, y) = \tan^{-1} \left(\frac{I_3(x, y) - I_1(x, y)}{I_2(x, y) - I_1(x, y)} \right). \quad (65)$$

2.8.2 CONTRASTE DE FASE

Frits Zernike desarrolló la técnica de contraste de fase en 1935, en la cual transforma las diferencias de fase en diferencia de amplitud, al colocar un filtro en el plano focal remarca las diferencias de fase entre la luz enfocada y la luz difractada.

Suponiendo que un objeto transparente con transmitancia de amplitud:

$$t_A(\xi, \eta) = e^{i\theta(\xi, \eta)}, \quad (66)$$

está coherentemente iluminado en un sistema de formación de imágenes.

Asumimos, por simplicidad matemática, la amplitud unitaria y se descarta la extensión finita de las pupilas de entrada y salida del sistema. Además, una condición necesaria para lograr la linealidad entre el cambio de fase y la intensidad es que la parte variable del desplazamiento de fase inducido por el objeto $\Delta\theta$, debe ser menor a 2π radianes.

Entonces la transmitancia se reescribe:

$$t_A(\xi, \eta) = e^{i\theta_0} e^{i\Delta\theta}, \quad (67)$$

donde θ_0 representa el cambio de fase promedio a través del objeto

Con ayuda de la serie de Taylor, tomando solo los dos primeros términos debido a que los demás son muy pequeños y ya no aportan información a la ecuación, podemos expresar t_A como:

$$t_A(\xi, \eta) \approx e^{(i\theta_0)}(1 + (i\Delta\phi(\xi, \eta))). \quad (68)$$

En esta ecuación, hemos despreciado los términos en $(\Delta\theta)^2$ y potencias superiores, asumiendo que son cero en nuestra aproximación, y la cantidad θ_0 representa el cambio de fase promedio a través del objeto, por lo que $\Delta\theta(\xi, \eta)$ por definición no tiene componente espectral de frecuencia cero.

Tenga en cuenta que el primer término a la derecha de la ecuación anterior representa un componente de onda fuerte que pasa a través de la muestra y sufre un cambio de fase uniforme θ_0 , mientras que el segundo término genera una luz difractada más débil que se desvía del eje óptico.

La imagen producida por un microscopio convencional podría escribirse, en esta aproximación, como:

$$I_i \approx |1 + i\Delta\theta|^2 \approx 1, \quad (69)$$

donde, para permanecer consistente con nuestra aproximación, el término $\Delta\theta^2$ ha sido reemplazado por cero. Zernike encontró que la luz difractada que surge de la estructura de fase no es observable en el plano de la imagen porque está en cuadratura de fase con el fondo fuerte, y que si esta relación de fase-cuadratura pudiera modificarse, es decir que de la ecuación no podemos obtener información, por lo que Zernike propuso insertar una placa de cambio de fase en el plano focal para modificar la relación de fase entre la luz enfocada y difractada.

La placa de cambio de fase puede consistir en un sustrato de vidrio sobre el que se ha depositado un pequeño punto dieléctrico transparente. El punto está centrado en el eje óptico en el plano focal y tiene un espesor y un índice de refracción tales que retarda la fase de la luz enfocada en $\pi/2$ radianes o $3\pi/2$ radianes en relación con el retardo de fase de la luz difractada. En el primer caso, la intensidad en el plano de la imagen se vuelve contraste de fase positivo:

$$I_i \approx \left| e^{i\left(\frac{\pi}{2}\right)} + i\Delta\theta \right|^2 = |i(1 + \Delta\theta)|^2 \approx 1 + 2\Delta\theta. \quad (70)$$

Y para la intensidad para contraste de fase negativo:

$$I_i \approx \left| e^{i\left(\frac{3\pi}{2}\right)} + i\Delta\theta \right|^2 = |-i(1 - \Delta\theta)|^2 \approx 1 - 2\Delta\theta. \quad (71)$$

Por lo tanto, la intensidad de la imagen se relaciona linealmente con las variaciones del cambio de fase $\Delta\theta$. (Goodman, 2005).

2.9 IMAGENOLÓGÍA DE FASE CUANTITATIVA

Las técnicas de QPI (Quantitative Phase Imaging) emplean el principio de interferometría para medir el campo óptico, que consta de información de amplitud y fase, mientras que las imágenes de campo claro convencionales solo miden la amplitud (Figura 5).

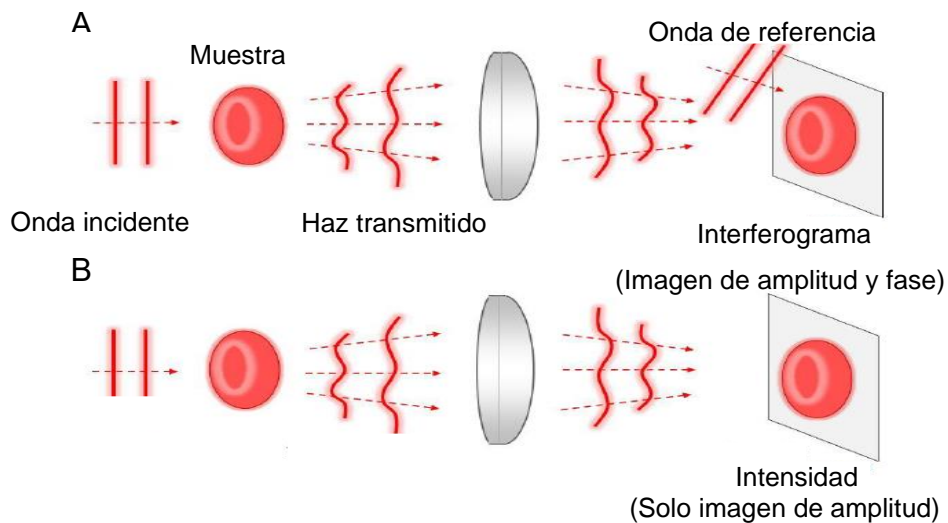


Figura 5. Principios de QPI. (A) QPI emplea el principio de interferometría u holografía, y mide información tanto de amplitud como de fase; (B) Las imágenes de campo brillante convencionales miden solo información de amplitud. Imagen tomada de (Lee et al., 2013)

Dado que la mayoría de las muestras biológicas, incluidas las biomoléculas, las células y los tejidos, son transparentes a la luz visible, la información de amplitud no proporciona un buen contraste para la obtención

de imágenes. Sin embargo, incluso estas muestras transparentes proporcionan un retraso de fase óptico significativo, que sirve como contraste de imagen para QPI (Creath, 1988).

2.9.1 TÉCNICAS QPI.

Las técnicas QPI se caracterizan por ciertos parámetros que cuantifican su desempeño. Los principales factores son: velocidad de adquisición, resolución transversal, sensibilidad de fase temporal y sensibilidad de fase espacial.

- Muestreo temporal: Velocidad de adquisición.

Establece los fenómenos más rápidos que pueden ser estudiados por un método QPI. De acuerdo con el teorema de muestreo de Nyquist (o teorema de Nyquist-Shannon), la frecuencia de muestreo debe ser al menos el doble de la frecuencia de la señal de interés. En QPI, las tasas de adquisición varían ampliamente con la aplicación, desde >100 Hz en el caso de fluctuaciones de membrana a <1 mHz al estudiar el ciclo celular. La tasa de adquisición máxima de los sistemas QPI depende de la modalidad utilizada para la recuperación de fase. Por supuesto, en este caso la velocidad de adquisición solo está limitada por la propia cámara. La tecnología actual brinda acceso a cámaras que pueden adquirir más de 1000 cuadros por segundo con una resolución de megapíxeles por cuadro (Popescu, 2017).

- Muestreo espacial: Resolución transversal.

En QPI es deseable preservar la resolución limitada por difracción proporcionada por el microscopio. Encontramos que la resolución transversal en el caso de una apertura circular está dada por $\rho_0 = 1.22\lambda/NA$, donde λ es la longitud de onda y NA la apertura numérica, que está definida por el índice de refracción y el semiángulo, θ , subtendido por

la pupila de entrada desde el plano de la muestra, $NA = n \sin \theta$. (no aplica para la obtención de imágenes de objetos de fase) (Popescu, 2011).

- Estabilidad temporal: Sensibilidad de fase temporal

Se refiere al cambio de fase (ruido) que ocurre por los movimientos externos al sistema como: fluctuaciones de aire, vibraciones mecánicas de componentes ópticos, vibraciones en la mesa óptica, etc. Por ejemplo, al estudiar las fluctuaciones de la membrana de los glóbulos rojos se requiere una sensibilidad de desplazamiento del orden de 1 nm, lo que se traduce aproximadamente en una sensibilidad de fase temporal de 5 a 10 mrad, según la longitud de onda (Popescu, 2017).

- Sensibilidad de fase espacial.

De manera análoga al ruido de fase "cuadro a cuadro", hay un ruido de fase "punto a punto" (espacial) que afecta la medición de QPI. Esta sensibilidad de fase espacial limita el cambio de índice de refracción o topográfico más pequeño que el sistema QPI puede detectar, la sensibilidad de fase se puede aumentar significativamente si la medición pasa una banda alrededor de una determinada frecuencia espacial.

Las faltas de uniformidad espacial en el fondo de fase se deben principalmente al patrón de interferencia aleatorio (es decir, moteado) producido por campos dispersados por impurezas en la óptica, reflejos especulares de varias superficies en el sistema, etc. Este ruido espacial es peor cuando se utilizan fuentes altamente coherentes, es decir, láseres. El uso de luz blanca como iluminación reduce drásticamente los efectos del speckle (Popescu, 2011).

Con estas definiciones podemos categorizar las técnicas generales de QPI como se muestra en la tabla 1, donde los métodos fuera de eje generan mejor nivel de adquisición de datos, los métodos de desplazamiento de fase

ayudan en la resolución transversal, a los métodos de camino común no les afectan tanto los ruidos externos, los movimientos (sensibilidad temporal).

Tabla 1. Métodos QPI generales con respecto al rendimiento del método. Tabla obtenida de Popescu, 2011.

	<i>Tasa de adquisición</i>	<i>de Resolución transversal</i>	<i>Sensibilidad temporal</i>	<i>Sensibilidad espacial</i>
Fuera del eje	X			
Cambio de fase		X		
Camino común			X	
Luz blanca				X

Sin embargo, existen métodos que combinan estos cuatro enfoques, buscando sumar los respectivos beneficios individuales. Por lo tanto, hay 6 combinaciones posibles de dos geometrías, como sigue:

- Fuera del eje y desplazamiento de fase.
- Desplazamiento de fase y luz blanca.
- Desplazamiento de fase y camino común.
- Fuera del eje y camino común.
- Camino común y luz blanca.
- Fuera del eje y luz blanca (este método también es una ruta común)

Más recientemente, incluso se han combinado tres de estos enfoques. El número posible de combinaciones es 4:

- Cambio de fase, camino común, luz blanca,
- Fuera del eje, camino común, luz blanca.
- Fuera del eje, cambio de fase, ruta común.
- Fuera del eje, cambio de fase, luz blanca (quizás por desarrollar)

2.9.1.1 FUERA DEL EJE

El uso de un haz de referencia inclinado se denomina comúnmente interferometría fuera de eje (o de corte), este método aprovecha la modulación de fase espacial introducida por la onda del plano de referencia desplazada angularmente y la medición resuelta espacialmente que permite una matriz de detectores 2D, como un CCD (Lee et al., 2013). Para este método tenemos dos ejemplos, la Microscopía Holográfica Digital (DHM) (figura 6).

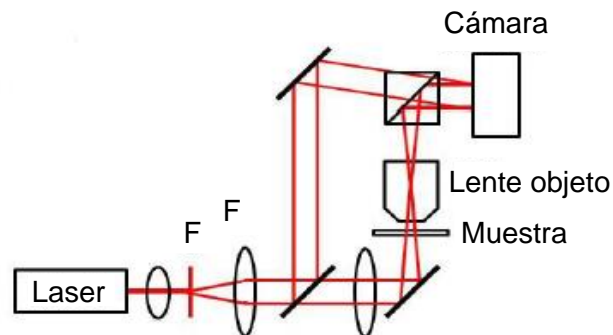


Figura 6. Microscopía holográfica digital, interferometría Mach-Zehnder de dominio espacial (F: filtro espacial) Imagen tomada de K. Lee et al., 2013.

También podemos mencionar a la microscopía de fase de Hilbert (HPM) (figura 7), el cual está diseñado específicamente para obtener imágenes de especímenes ópticamente delgados, como células, y, como tal, emplea una geometría en la que el interferograma se registra en el plano de la imagen, en lugar de en un plano desenfocado (Fresnel) (Popescu, 2011).

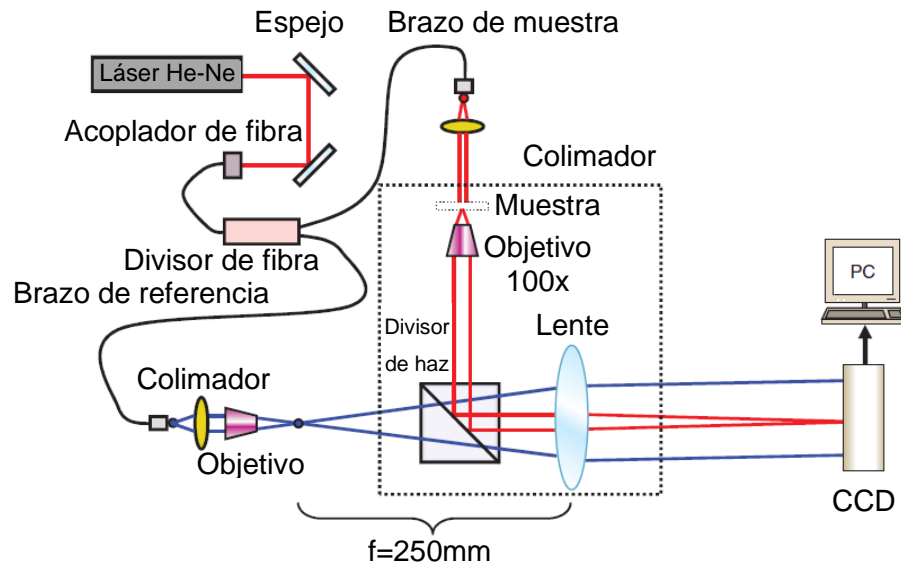


Figura 7. Configuración experimental HPM. Imagen tomada de Popescu, 2011.

2.9.1.2 DESPLAZAMIENTO DE FASE

El desplazamiento de fase (figura 8) se ha utilizado durante mucho tiempo en la interferometría como un medio eficaz para extraer información de fase. La idea es introducir un control sobre la diferencia de fase entre dos campos de interferencia, de modo que la intensidad de la señal resultante tenga la forma:

$$I(\delta\theta) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \cos(\theta + \delta\theta), \quad (72)$$

donde θ es la fase a medir y $\delta\theta$ es el cambio de fase agregado intencionalmente, $\delta\theta = \omega(t - t_R)$. La ecuación 72 tiene tres incógnitas: las intensidades de los dos campos, I_1 e I_2 , y su diferencia de fase, θ . Por lo tanto, el número mínimo de mediciones (y, por lo tanto, de cambios de fase) requerido es tres. Sin embargo, esto solo proporciona el valor de θ sobre la mitad del círculo trigonométrico. Esto se debe a que las funciones seno y coseno son biyectivas solo en la mitad del círculo, $(-\pi/2, \pi/2)$ y $(0, \pi)$, respectivamente. Por lo tanto, lo más común es que los métodos de

desplazamiento de fase utilicen cuatro cambios de fase en incrementos de $\pi/2$ (Lee et al., 2013)

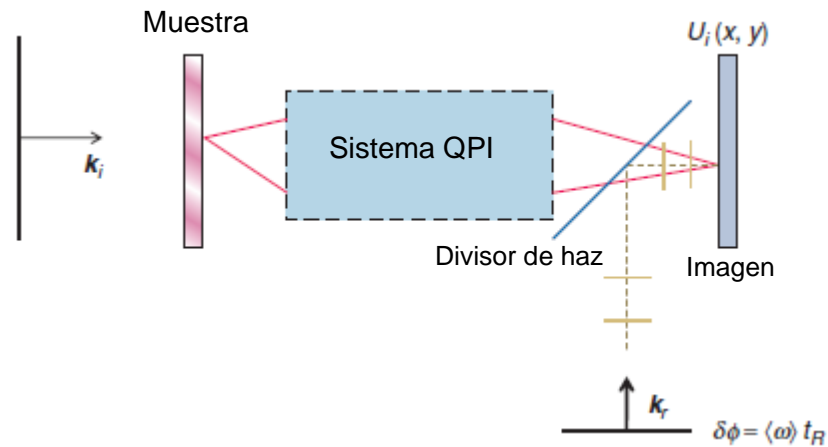


Figura 8. Esquema de la interferometría por desplazamiento de fase: vectores de onda incidente y de referencia (k_i y k_r), respectivamente. Imagen tomada de Popescu, 2011.

2.9.1.3 CAMINO COMÚN

La clave para una interferometría estable es la capacidad de bloquear la diferencia de fase entre la referencia y el haz de la señal en cuadratura, sin verse afectado por la vibración mecánica o la deriva térmica. La interferometría de ruta común es un enfoque establecido que logra este bloqueo de fase con una configuración óptica en la que la señal y las ondas de referencia comparten una ruta común desde el objetivo hasta el detector (Zhao et al., 2007), ya que dividimos la señal, una parte se perturba para que actúe como una referencia sintética para la parte no perturbada del frente de onda de la señal (Glückstad & Mogensen, 2001).

Hay muchas formas de establecer interferometría de camino común que se dividen aproximadamente en dos categorías: configuraciones de división de frente de onda y división de amplitud.

2.9.1.4 MÉTODOS DE LUZ BLANCA

Gran parte de las faltas de uniformidad espacial que tienen el efecto de suavizar los detalles en una imagen de fase cuantitativa son causadas por motas. Este fenómeno de interferencia aleatoria ocurre debido a la superposición coherente de varios campos tanto del espécimen mismo como de los reflejos espurios de las interfaces en la configuración óptica, o la dispersión no deseada de la suciedad y las imperfecciones asociadas con la óptica. La luz de coherencia corta limita la aparición de estos patrones de interferencia aleatorios no deseados (moteado). La luz blanca proporciona una longitud de coherencia del orden de $1 \mu m$. Por lo tanto, la superposición entre varios componentes de campo es coherente solo si las diferencias de longitud de camino son de este orden o más cortas. En general, la luz blanca tiene el efecto de eliminar casi por completo la estructura moteada.

Hay muchos métodos interferométricos que se han implementado con luz blanca. Dos métodos QPI de luz blanca que se han usado con éxito en investigaciones biológicas son, por ejemplo: QPI que utiliza la ecuación de transporte de intensidad y Microscopía de Interferencia de Luz Espacial (SLIM) (figura 9).

Este último combina la uniformidad espacial asociada con la iluminación de luz blanca y la estabilidad de la interferometría de camino común. SLIM se implementa como un módulo adicional al contraste de fase existente. microscopios y, por lo tanto, se superpone inherentemente a la imagen de fase cuantitativa con los canales de fluorescencia del microscopio. SLIM proporciona imágenes sin manchas, lo que confiere medidas de longitud de trayecto óptico espacialmente sensibles (0.3 nm). La geometría del camino común permite la medición de la longitud del camino óptico sensible al tiempo (0.03 nm). Debido a la corta longitud de coherencia del campo de luz blanca, SLIM puede generar imágenes tomográficas en 3D de estructuras

transparentes simplemente escaneando la muestra a través del foco. (Wang et al., 2011)

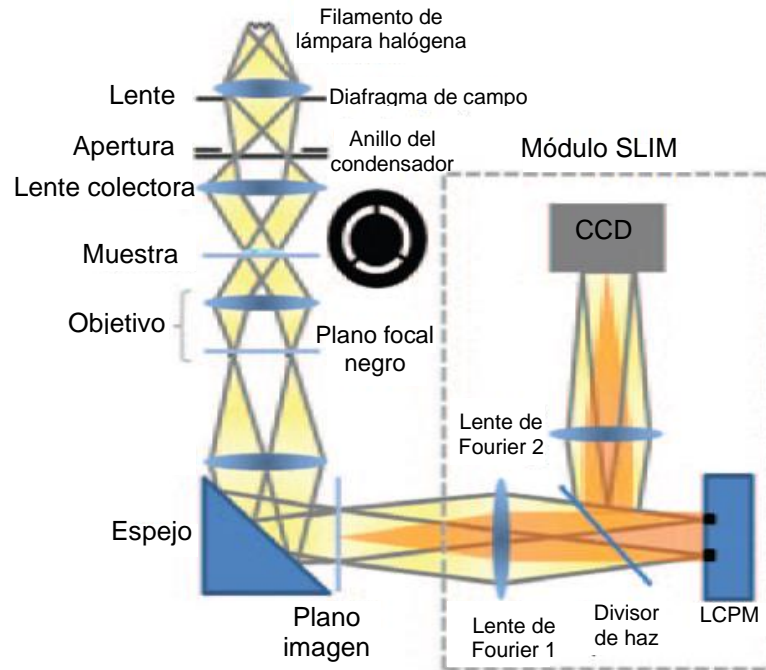


Figura 9. Configuración esquemática para SLIM. El módulo SLIM se conecta a un microscopio de contraste de fase comercial (Axio Observer Z1, Zeiss, en este caso) (Liquid crystal phase modulator: LCPM). Imagen tomada de Wang et al., 2011.

En la figura 8 vemos que el filamento de la lámpara se proyecta sobre el anillo del condensador. El anillo se ubica en el plano focal del condensador, que colima la luz hacia la muestra. Para la microscopía de contraste de fase convencional, el objetivo de fase contiene un anillo de fase, que retrasa la luz no dispersada en un cuarto de longitud de onda y también la atenúa en un factor de 5. La imagen se entrega a través de la lente del tubo al plano de la imagen, donde el módulo SLIM lo procesa más. La lente de Fourier L1 transmite el plano focal posterior del objetivo a la superficie del modulador de fase de cristal líquido (LCPM, Boulder Nonlinear). Al mostrar diferentes máscaras en el LCPM, el retardo de fase entre los componentes dispersos y no dispersos se modula con precisión. La lente de Fourier L2 reconstruye la imagen final en el plano CCD, que se conjuga con el plano de la imagen.

CAPÍTULO 3.

DESPLAZAMIENTO DE FASE

La principal ventaja de la diferencia de fase sobre las técnicas fuera del eje es la capacidad de representar mapas de fase cuantitativos a través de operaciones matemáticas simples, es decir, sustracciones y divisiones, lo que en general reduce el ruido espacial. A continuación, presentamos dos métodos QPI de cambio de fase que ya han demostrado su capacidad para estudios biológicos: microscopía de interferencia registrada digitalmente con cambio de fase automático y microscopía de cuadratura óptica (Popescu, 2011).

3.1 MICROSCOPIA DE INTERFERENCIA REGISTRADA DIGITALMENTE CON DESPLAZAMIENTO DE FASE AUTOMÁTICO (DRIMAPS)

Los datos primarios generados por el sistema consisten en imágenes de interferencia de cambio de fase (PSI) que son mapas de densidad precisos de la distribución de masa seca (material no acuoso) dentro de las células. Las secuencias de lapso de imágenes PSI pueden verse como secuencias de películas o procesarse de varias maneras para revelar muchos aspectos diferentes de la dinámica del crecimiento celular y el comportamiento móvil.

Este método QPI de cambio de fase se implementa en un microscopio Horn existente. Este arreglo experimental se muestra en la figura 10.

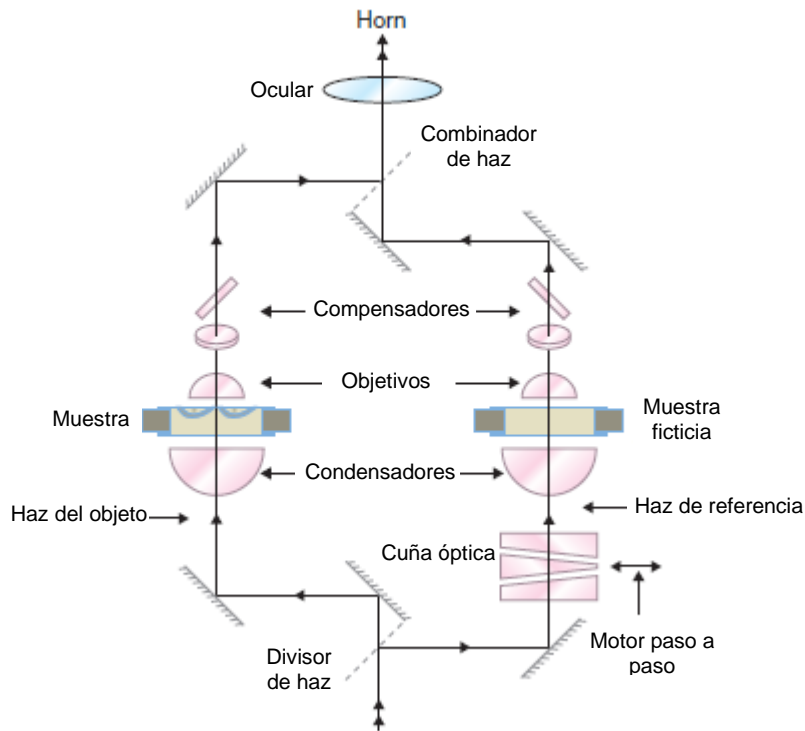


Figura 10. Sistema DRIMAPS implementado con un microscopio Horn. Imagen tomada de Popescu, 2011.

El divisor de haz separa la luz de iluminación en dos caminos para formar el interferómetro Mach-Zender. El brazo de referencia contiene un compensador de muestra ("muestra ficticio"), de modo que los dos brazos del interferómetro son ópticamente similares. Antes del detector, los dos haces se recombinan a través de un segundo divisor de haz. El cambio de fase en incrementos de $\pi/2$ se logra deslizando la cuña óptica horizontalmente. A partir de los cuatro cuadros de intensidad registrados, se obtiene la imagen de fase cuantitativa como en la típica interferometría de cambio de fase (Zicha & Dunn, 1995).

$$\phi(x, y) = \arg [I(x, y, 0) - I(x, y, \pi), I(x, y, 3\pi/2) - I(x, y, \pi/2)]. \quad (73)$$

Por otro lado, tenemos un arreglo similar basado en una plataforma de microscopio diferente, el microscopio Jamin-Lebedeff, como se muestra en la figura 11. La principal diferencia con respecto al microscopio Horn es que en

CAPÍTULO 3. DESPLAZAMIENTO DE FASE

el Jamin-Lebedeff, los dos caminos de luz del interferómetro se separan mediante óptica polarizadora. Así, el campo de iluminación se separa en dos haces a través de un divisor de haz polarizador, de manera que los campos resultantes tienen polarizaciones ortogonales.

El cambio de fase se logra controlando el ángulo de rotación del analizador con respecto a la placa de media onda ($\lambda/2$) La característica principal de este arreglo es su estabilidad. Sin embargo, puede surgir un inconveniente si la muestra presenta birrefringencia (Brown & Dunn, 1989).

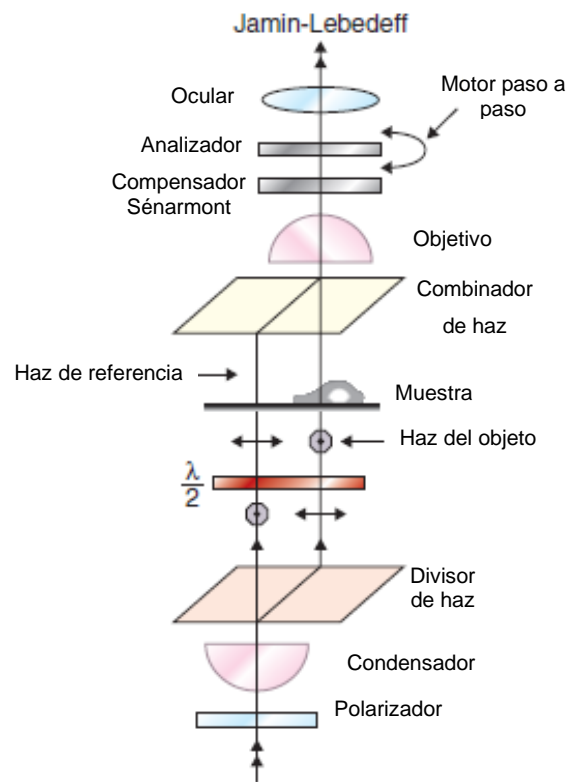


Figura 11. Sistema DRIMAPS implementado con un microscopio Jamin-Lebedeff. El interferómetro de Mach-Zehnder se obtiene mediante óptica de polarización. Imagen tomada de Popescu, 2011.

3.2 MICROSCOPIA DE CUADRATURA ÓPTICA (OQM)

Esta técnica de cuadratura se adaptó del radar láser, donde se aplicó para determinar el signo de la velocidad Doppler. Como se muestra en la figura 12, el principio se basa en el uso de placas de onda de polarización para agregar cambios de fase entre los dos campos en un interferómetro Mach-Zender.

La placa de cuarto de onda en el brazo de referencia transforma la polarización lineal inicial en polarización circular. Después de combinar los dos campos a través del segundo divisor de haz, el analizador logra la diferencia de cambio de fase deseada mediante rotaciones con ángulos controlados. Por lo tanto, con dos mediciones en cuadratura (es decir, $\pi/2$ fuera de fase), se obtienen los componentes coseno y seno de la imagen de fase de interés. Si las intensidades de los haces de referencia y de muestra se miden por separado, la información de fase se obtiene de forma única (DiMarzio, 1999; Warger & DiMarzio, 2009) .

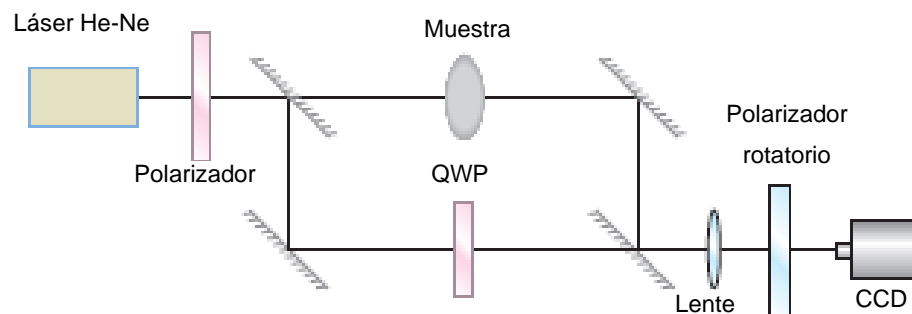


Figura 12. Configuración interferómetro de cuadratura (QWP: placa de cuarto de onda). Imagen tomada de Popescu, 2011.

CAPÍTULO 4.

CAMINO COMÚN

La interferometría de camino común es una solución valiosa para lograr mediciones de fase estable. En esencia, estos métodos operan por el principio físico arraigado en la siguiente observación: Una imagen de microscopio (p. ej., campo claro, contraste de fase), aunque sea un interferograma, es extremadamente estable. Esta estabilidad ocurre porque todos los campos de interferencia que componen la imagen (es decir, todos los componentes de Fourier dispersos de la muestra) viajan muy cerca unos de otros, pasando a través de los mismos componentes ópticos. Por lo tanto, el ruido causado por las fluctuaciones del aire y las vibraciones en los componentes es común a todos los campos y se anula en gran medida en el interferograma resultante.

A continuación, dos métodos usados del método de camino común: La microscopía de fase de Fourier, un método de desplazamiento de fase y camino común, y la microscopía de fase de difracción, un método de camino común y fuera del eje.

4.1 MICROSCOPIA DE FASE DE FOURIER (FPM)

Abbe-Porter explica la formación de imágenes como un fenómeno de interferencia. En particular, la imagen del microscopio se puede describir como la interferencia entre la luz dispersada de la muestra y la luz promedio no dispersada, que actúa como campo de referencia. Más tarde, esta imagen abrió la puerta a la microscopía de contraste de fase, como ya vimos, en la que Zernike mejoró el contraste de este interferograma al tener los dos campos en cuadratura y hacer coincidir sus amplitudes (Popescu, 2011).

La microscopía de fase de Fourier es un método que utiliza los mismos principios para extraer cuantitativamente la fase a través de la muestra.

Usando la descomposición de Fourier (de ahí el nombre) de un campo de imagen óptica de baja coherencia en dos componentes espaciales que se pueden cambiar de fase de forma controlada entre sí, se puede obtener una imagen de fase cuantitativa de alta resolución transversal.

FPM combina los principios de la microscopía de contraste de fase y la interferometría de desplazamiento de fase, mediante la cual la luz dispersada y no dispersada de una muestra se utiliza como el objeto y campos de referencia de un interferómetro (Popescu et al., 2004). La configuración experimental se muestra en la figura 13.

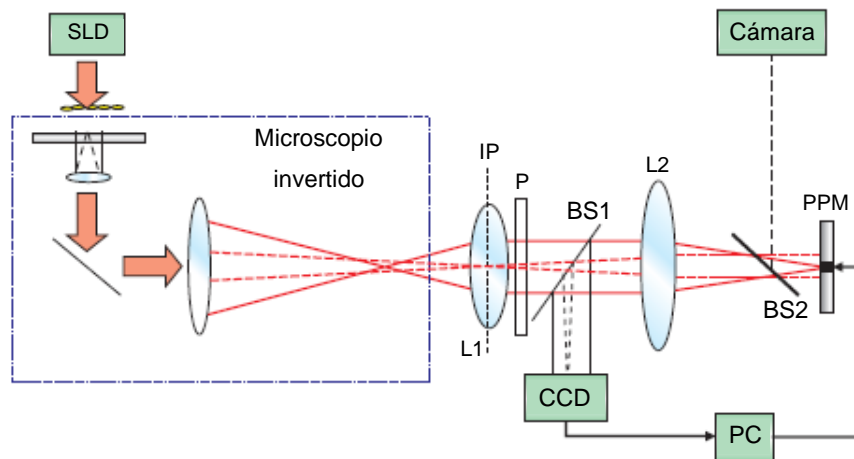


Figura 13. Configuración experimental del método FPM. Imagen tomada de Popescu, 2011.

El campo de baja coherencia colimado de un diodo superluminiscente (SLD, longitud de onda central de 809 nm y ancho de banda de 20 nm) se utiliza como fuente de iluminación para un microscopio invertido típico. A través del puerto de salida, el microscopio produce una imagen ampliada posicionada en el plano de imagen (IP). La lente, L1, se coloca en el mismo plano IP y tiene una distancia focal tal que colima el campo de frecuencia espacial cero.

La transformada de Fourier del campo de la imagen es proyectada por la lente, L2 (distancia focal de 50 cm), sobre la superficie de un modulador de fase programable (PPM), esencialmente un modulador de luz espacial utilizado en "modo de fase". Este PPM consta de una matriz de cristal líquido bidimensional con dirección óptica y 768 × 768 píxeles activos. El polarizador, P, ajusta la polarización del campo en una dirección paralela al eje del cristal líquido. En esta configuración, el PPM produce un control preciso sobre la fase de la luz reflejada por su superficie. El tamaño de píxel de PPM es de 26 × 26 μm^2 , mientras que el rango dinámico del control de fase es de 8 bits sobre 2π . En ausencia de modulación PPM, se forma una réplica exacta de fase y amplitud del campo de imagen en el plano CCD, a través del divisor de haz BS1. Con fines de alineación, se utiliza una cámara para obtener imágenes de la superficie del PPM a través del divisor de haz BS2.

El PPM se usa para cambiar de forma controlada la fase del componente de campo disperso, U_1 , (línea de puntos) en cuatro incrementos sucesivos de $\pi/2$ con respecto al campo promedio, U_0 (línea continua), como en las mediciones típicas de interferometría de cambio de fase. La diferencia de fase entre U_1 y U_0 se obtiene combinando cuatro interferogramas registrados de la siguiente manera

$$\Delta\varphi(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{I(x, y; 3\pi/2) - I(x, y; \pi/2)}{I(x, y; 0) - I(x, y; \pi)} \right], \quad (74)$$

donde $I(x, y; \alpha)$ representa la distribución de irradiancia del interferograma correspondiente al cambio de fase, α . Si definimos $\beta(x, y) = |U_1(x, y)|/|U_0|$, entonces se puede determinar la fase asociada con el campo de imagen $U(x, y)$:

$$\varphi(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{\beta(x, y) \sin(\Delta\varphi(x, y))}{1 + \beta(x, y) \cos(\Delta\varphi(x, y))} \right]. \quad (75)$$

La relación de amplitud, β , contenida en la ecuación. (75) se puede obtener de los cuatro cuadros, usando que $\beta_{\phi \rightarrow 0} = 0$.

La frecuencia de recuperación de la imagen de fase está limitada por la frecuencia de actualización del PPM de cristal líquido, que en este caso es de 8 Hz. Sin embargo, esta tasa de adquisición se puede mejorar aún más utilizando un desfasador más rápido.

4.2 MICROSCOPIA DE FASE DE DIFRACCIÓN (DPM)

DPM (figura 14) es una técnica de formación de imágenes de fase cuantitativa que combina la función de disparo único de HPM, con la geometría de ruta común asociada con FPM, es decir se combina la estabilidad de fase asociada con los interferómetros de ruta común y las altas velocidades de adquisición de los métodos fuera del eje (Popescu et al., 2006).

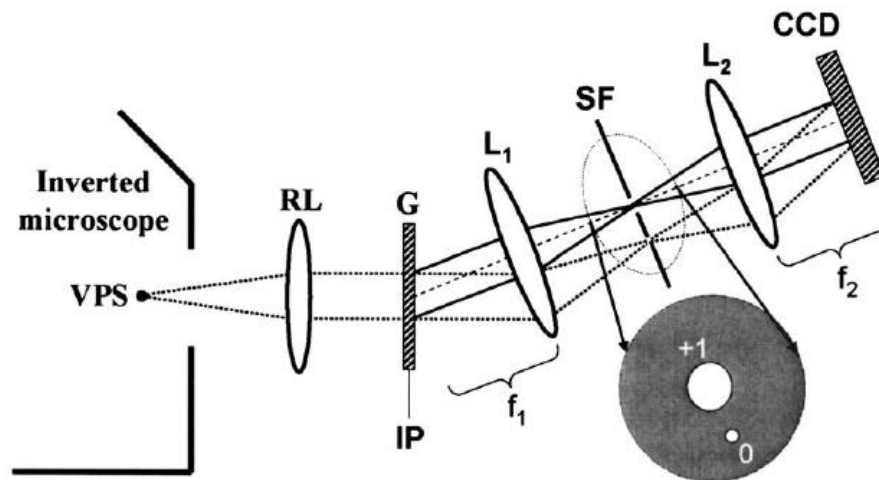


Figura 14. Configuración DPM. Imagen tomada de Popescu et al., 2006.

La radiación del segundo armónico de un láser Nd: YAG ($\lambda = 532$ nm) se utiliza como iluminación para un microscopio invertido, que produce la imagen ampliada de la muestra en el puerto de salida. La imagen del microscopio parece estar iluminada por un VPS (virtual source point) de punto de origen virtual. Una lente de relé, RL, colima la luz que se origina en VPS y replica la imagen del microscopio en el plano, IP. Una rejilla de fase de difracción G (por lo tanto, "microscopía de fase de difracción") se coloca en

este plano de imagen y genera múltiples órdenes de difracción que contienen información espacial completa sobre la imagen. El objetivo es seleccionar dos órdenes de difracción (0° y 1°) que puedan utilizarse como campos de referencia y de muestra en un interferómetro Mach-Zender muy compacto. Para lograr esto, se utiliza un sistema estándar de lentes de filtrado espacial, L1-L2, para seleccionar los dos órdenes de difracción y generar el interferograma final en el plano CCD. El haz de orden 0 se filtra en paso bajo utilizando el filtro espacial SF colocado en el plano de Fourier de L1, de modo que en el plano CCD se aproxima a un campo uniforme. El filtro espacial permite pasar todo el contenido de frecuencia del haz de 1er orden de difracción y bloquea todos los demás órdenes. El primer orden es, por lo tanto, el campo de formación de imágenes y el orden 0 desempeña el papel del campo de referencia. Los dos haces atraviesan los mismos componentes ópticos, es decir, se propagan a lo largo de un camino óptico común, lo que reduce significativamente el ruido de fase longitudinal. La dirección de la modulación espacial se eligió en un ángulo de 45° con respecto a los ejes x e y del CCD, de modo que el campo total en el plano del CCD tenga la forma:

$$U(x, y) = |U_0|e^{i(\phi_0 + \beta(x + y))} + |U_1(x, y)|e^{i\phi(x, y)}. \quad (76)$$

En la ecuación. (76), $|U_1|$ y $\phi_{0,1}$ son las amplitudes y la fase de, respectivamente, los órdenes de difracción 0, 1, mientras que β representa el cambio de frecuencia espacial inducido por la rejilla al orden 0 (es decir, la frecuencia espacial de la propia rejilla). Se debe tener en cuenta que, como consecuencia del teorema de la ordenada central, el campo de referencia es proporcional al promedio espacial del campo de imagen del microscopio,

$$|U_0|e^{i\phi_0} \propto \frac{1}{A} \int |U(x, y)| e^{i\phi(x, y)} dx dy \quad (77)$$

donde A es el área total de la imagen, La referencia para la interferometría es también el promedio espacial del campo de la imagen (Popescu et al., 2006).

CAPÍTULO 5.

ALGORITMOS NÚMERICOS.

En esta sección se presentan las simulaciones numéricas de los métodos QPI: Microscopia Holográfica Digital (DHM) de 2 haces y Microscopia de fase de Fourier (FPM).

Se generaron 4 interferogramas en ambos casos. En el caso de DHM, los retrasos de fase de la onda de referencia son: $0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$ rad. En el caso de FPM, los valores del filtro de Zernike son: $0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$ rad.

Para Microscopia Holográfica Digital (DHM) de 2 haces (Creath, 1988):

La diferencia de fase entre los dos frentes de onda se cambia a varios valores sucesivos en incrementos equidistantes en fase, es decir varios interferogramas cada uno con diferente valor de la diferencia de camino óptico, las modulaciones de desplazamiento puede ser cualquier valor menor de 2π . Con N mediciones de intensidad a medida que se desplaza la fase.

La intensidad se calcula mediante:

$$I_i(x, y) = a_0(x, y) + a_1(x, y) \cos \alpha_i + a_2(x, y) \sin \alpha_i, \quad (78)$$

donde:

$$\begin{aligned} a_0(x, y) &= I_0(x, y), \\ a_1(x, y) &= I_0(x, y) \cos \phi(x, y), \\ a_2(x, y) &= I_0(x, y) \sin \phi(x, y). \end{aligned}$$

La solución de mínimos cuadrados para estas ecuaciones es:

$$\begin{pmatrix} a_0(x, y) \\ a_1(x, y) \\ a_2(x, y) \end{pmatrix} = A^{-1}(\alpha_i) B(x, y, \alpha_i), \quad (79)$$

donde:

$$A = \begin{pmatrix} N & \sum \cos \alpha_i & \sum \sin \alpha_i \\ \sum \cos \alpha_i & \sum \cos^2 \alpha_i & \sum (\cos \alpha_i) \sin \alpha_i \\ \sum \sin \alpha_i & \sum (\cos \alpha_i) \sin \alpha_i & \sum \sin^2 \alpha_i \end{pmatrix}; B = \begin{pmatrix} \sum I_i(x, y) \\ \sum I_i(x, y) \cos \alpha_i \\ \sum I_i(x, y) \sin \alpha_i \end{pmatrix}.$$

Dado que usamos 4 interferogramas los retrasos de fase de la onda de referencia son: $0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$ rad por lo que las matrices A y B son:

$$A = \begin{pmatrix} 4 & 0 & 0 \\ 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 2 \end{pmatrix}; B = \begin{pmatrix} B0 \\ B2 \\ B3 \end{pmatrix},$$

donde B0, B2 y B3 son las sumatorias de las intensidades, entonces para encontrar a_0, a_1 y a_2 de la ecuación 78:

$$\begin{pmatrix} a_0(x, y) \\ a_1(x, y) \\ a_2(x, y) \end{pmatrix} = A^{-1}(a_1)B(x, y, \alpha_i),$$

$$\begin{pmatrix} 0.25 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5 & 0 \\ 0 & 0 & 0.5 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B0 \\ B2 \\ B3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0.25(B0) + 0(B2) + 0(B3) \\ 0(B0) + 0.5(B2) + 0(B3) \\ 0(B0) + 0(B2) + 0.5(B3) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0.25(B0) \\ 0.5(B2) \\ 0.5(B3) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_0(x, y) \\ a_1(x, y) \\ a_2(x, y) \end{pmatrix}.$$

Entonces para encontrar la fase, despejando los coeficientes:

$$\tan \phi(x, y) = \frac{a_2(x, y)}{a_1(x, y)}.$$

En el caso de FPM (Popescu et al., 2004), la diferencia de fase se obtiene combinando cuatro interferogramas registrados de la siguiente manera:

$$\Delta\phi(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{I(x, y; 3\pi/2) - I(x, y; \pi/2)}{I(x, y; 0) - I(x, y; \pi)} \right]. \quad (80)$$

El parámetro β , se obtiene de la siguiente forma:

$$\beta(x, y) = \gamma \frac{[I_0 - I_2 + I_3 - I_1]}{\sin[\Delta\phi(x, y)] + \cos[\Delta\phi(x, y)]}.$$

Entonces se puede determinar la fase asociada con el campo de imagen:

$$\phi(x, y) = \tan^{-1} \left\{ \frac{\beta(x, y) \sin(\Delta\phi(x, y))}{1 + \beta(x, y) \cos(\Delta\phi(x, y))} \right\}. \quad (81)$$

Para la primera parte de comparaciones se usó una función Gaussiana como objeto de entrada (figura 15a), en un espacio de trabajo de 2048x2048 pixeles.

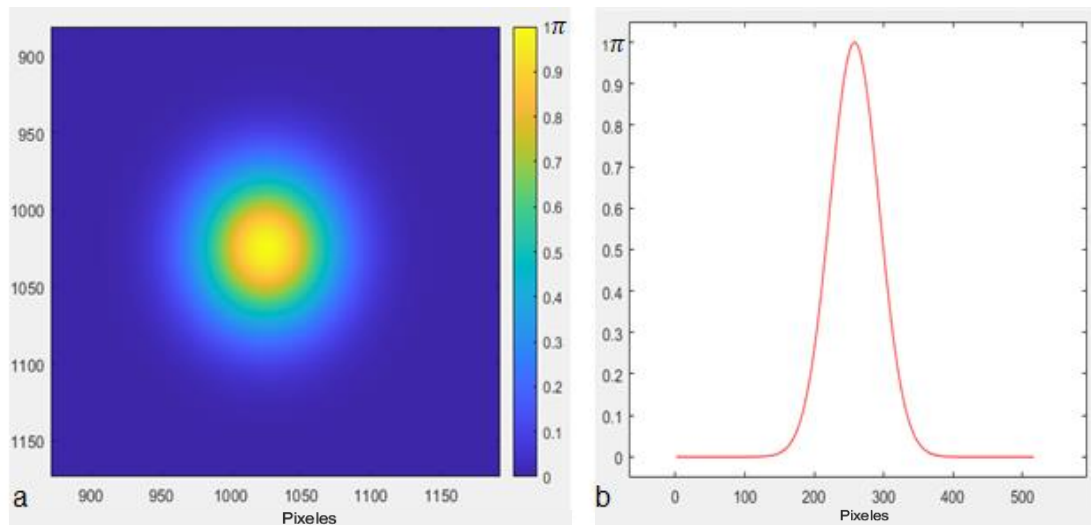


Figura 15. Función Gaussiana.

Para la segunda parte de comparaciones se decidió usar un objeto de entrada binario (figura 16a), un círculo de 100 pixeles de radio en el mismo espacio de trabajo de 2048x2048 pixeles, en este trabajo se usó el software Matlab®.

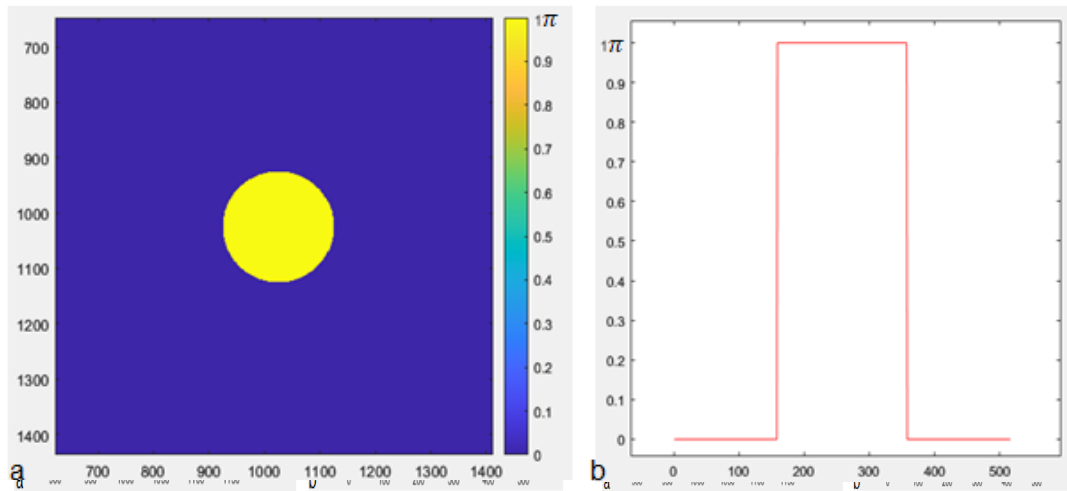


Figura 16. Objeto binario.

Se aplicaron ambas técnicas y se graficó una línea que pasa al centro de la imagen de entrada (como en las figuras 15b y 16b), así como en la imagen obtenida para verificar los resultados de la diferencia de fase encontrada en ambos métodos.

CAPITULO 6.

RESULTADOS

En este capítulo se muestran los datos obtenidos al implementar los algoritmos que se vieron en el capítulo anterior, cambiando algunas variables para poder visualizar las diferencias y errores, a continuación, se presentan las tablas comparativas.

Para comenzar se varió de fase del objeto aplicando ambos métodos usando como objeto de entrada una función Gaussiana y empleando un filtro ideal (un pixel), con el fin de visualizar el error al incrementar dicha fase.

Más adelante, la variable que se modifica es el tamaño del filtro, empezando con el ideal (un pixel) y luego incrementando, simulando círculos que aumentan en tamaño, además de usar como objeto de entrada la función gaussiana constante.

A continuación, se repite el primer experimento, pero con un objeto de entrada binario (es decir dos valores, máximo y mínimo), para ver los errores y comparar cómo se comporta con distintos objetos de entrada.

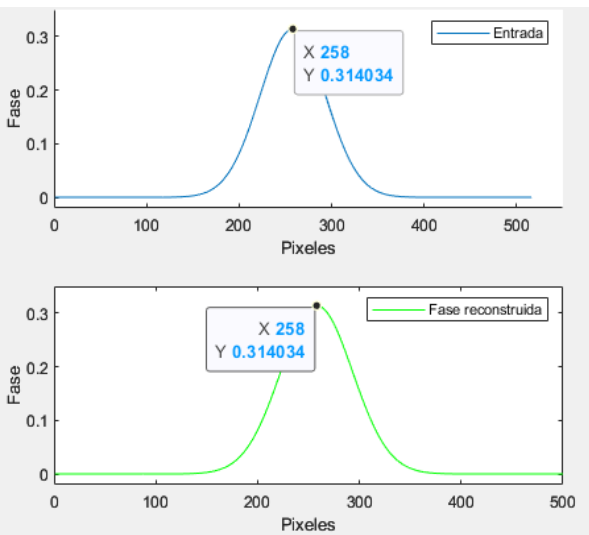
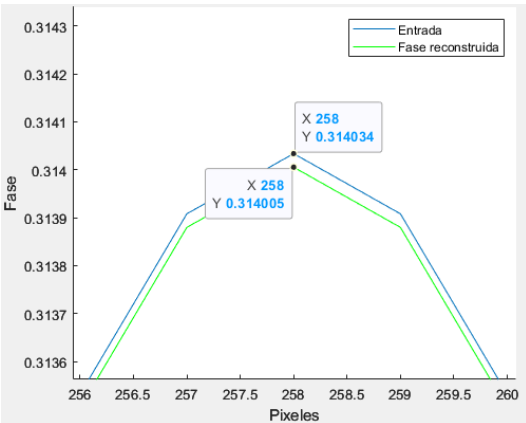
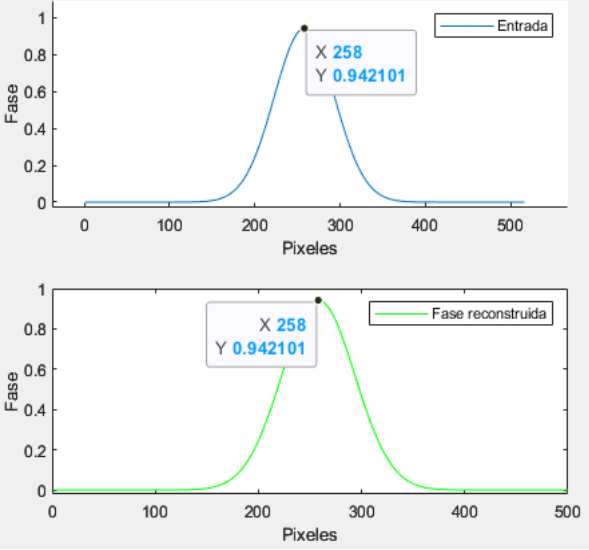
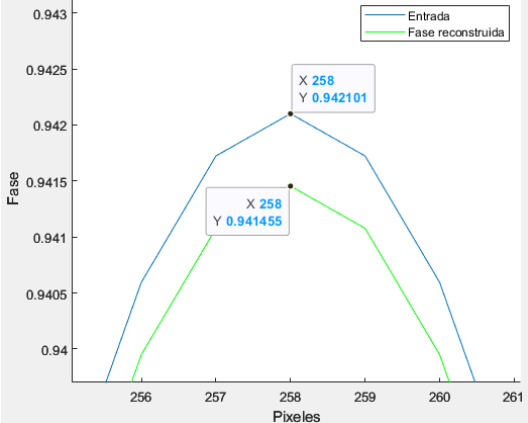
Finalmente vemos el efecto de la amplitud y fase al implementar ambos métodos cambiando la amplitud del objeto de entrada, empleando la función Gaussiana como objeto de entrada y de fase constante.

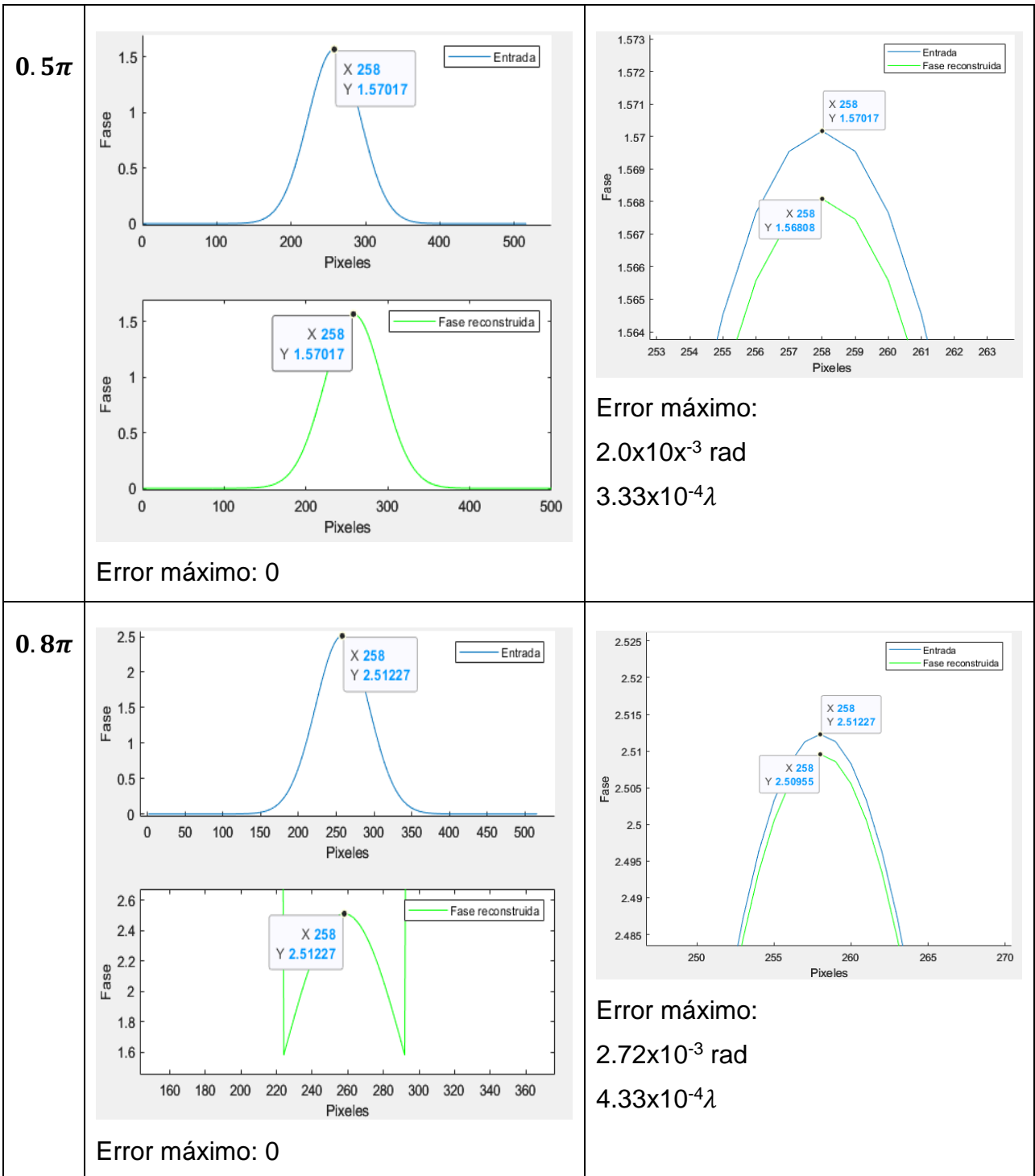
6.1 MÁXIMA FASE DEL OBJETO (GAUSS).

La fase de los objetos biológicos que se analizan con estos métodos varía en tamaño, vamos a hacer una comparación de las fases obtenidas al cambiar estas fases en las simulaciones, se debe recuperar una fase muy similar a la que estamos introduciendo en cada método.

En seguida, en la tabla 2, se muestran ambos métodos comparados mientras varia la fase del objeto, con el tamaño del filtro ideal (un pixel) y con las fases: 0.1π , 0.3π , 0.5π y 0.8π radianes.

Tabla 2. Comparación de imágenes con variación en el tamaño de la fase de objeto (Gauss).

Fase	Método DHM	Método FPM
0.1π	 <p>Error máximo: 0</p>	 <p>Error máximo: 2.9×10^{-5} rad; $4.62 \times 10^{-6} \lambda$</p>
0.3π	 <p>Error máximo: 0</p>	 <p>Error máximo: 6.46×10^{-4} rad; $1.03 \times 10^{-4} \lambda$</p>



Podemos observar que en el método de FPM el error aumenta de acuerdo con el incremento en el tamaño de la fase del objeto de entrada, es


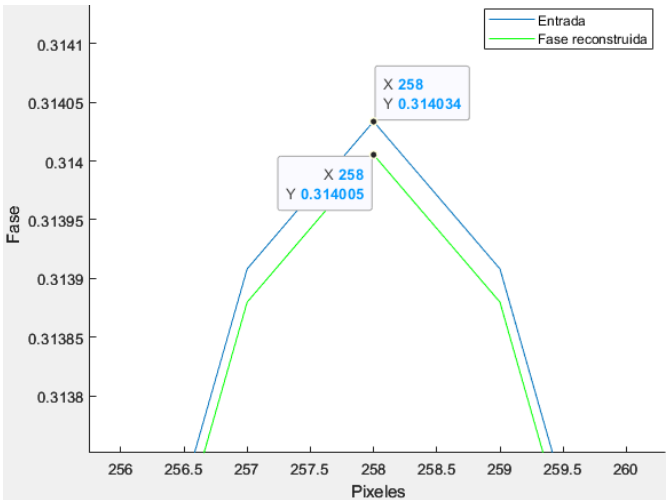
decir que la fase recuperada no es exacta (aunque en ningún método lo es), por otro lado, en el método DHM hay error aparente.


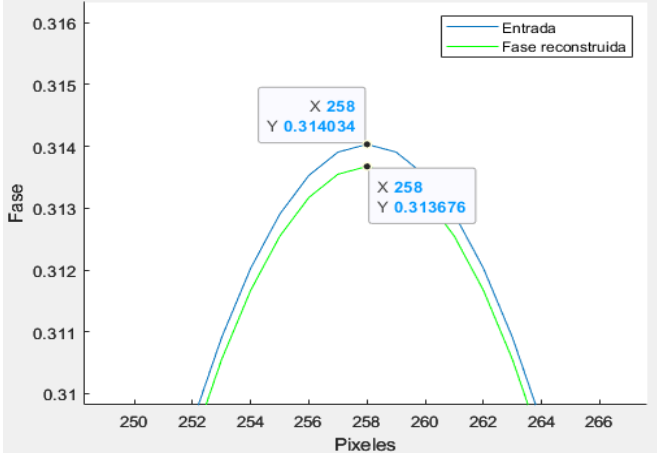
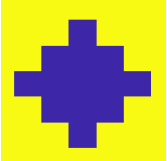
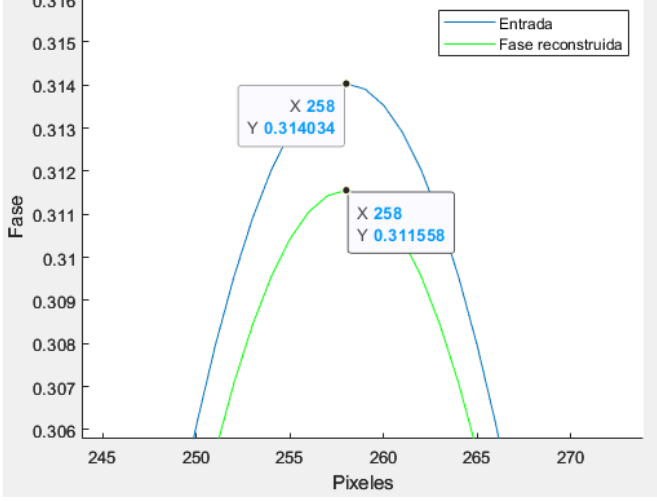

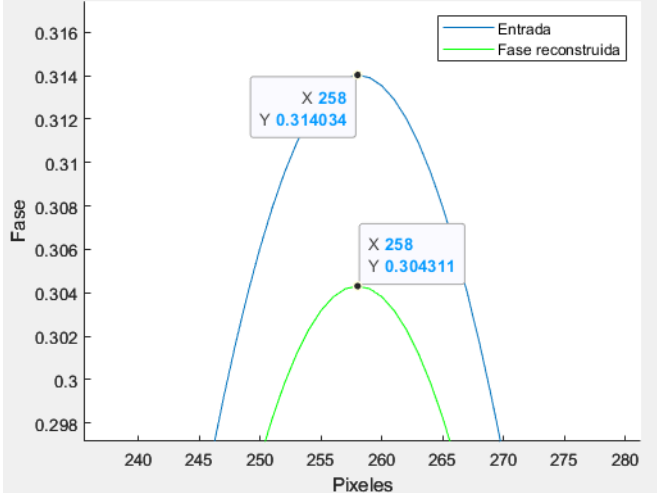
6.2 TAMAÑO DEL FILTRO EN EL MÉTODO FPM (GAUSS)

Ahora vamos a modificar el tamaño del filtro en el método FPM, aplicando como objeto de entrada la función Gaussiana con valor de 0.1π .

Primero con el filtro ideal (un pixel), y luego simulando círculos que incrementan en tamaño como podemos ver en la tabla 3 (donde ω_0 es la cintura del haz), para ver el error que puede resultar al aplicar este método experimental.

Tabla 3. Comparación de imágenes con variación en el tamaño del filtro.

Filtro	Imagen obtenida	Error máximo
<p>1x1(ideal)</p> 		<p>2.9×10^{-5} rad</p> <p>$4.62 \times 10^{-6} \lambda$</p>

$\frac{\omega_0}{10}$ 		3.58×10^{-4} rad $5.69 \times 10^{-5} \lambda$
$\frac{\omega_0}{3.84}$ 		2.47×10^{-3} rad $3.94 \times 10^{-4} \lambda$
$\frac{\omega_0}{1.72}$ 		9.72×10^{-3} rad $1.54 \times 10^{-3} \lambda$

El incremento en el tamaño del filtro y el error obtenido son directamente proporcionales ya que al aumentar una, la otra también aumenta, sin embargo, al hacer más grande el tamaño del filtro también empezamos a tener deformación a la hora de obtener la fase reconstruida como podemos ver en la figura 17, que corresponde al filtro más grande ($\omega_0/1.72$).

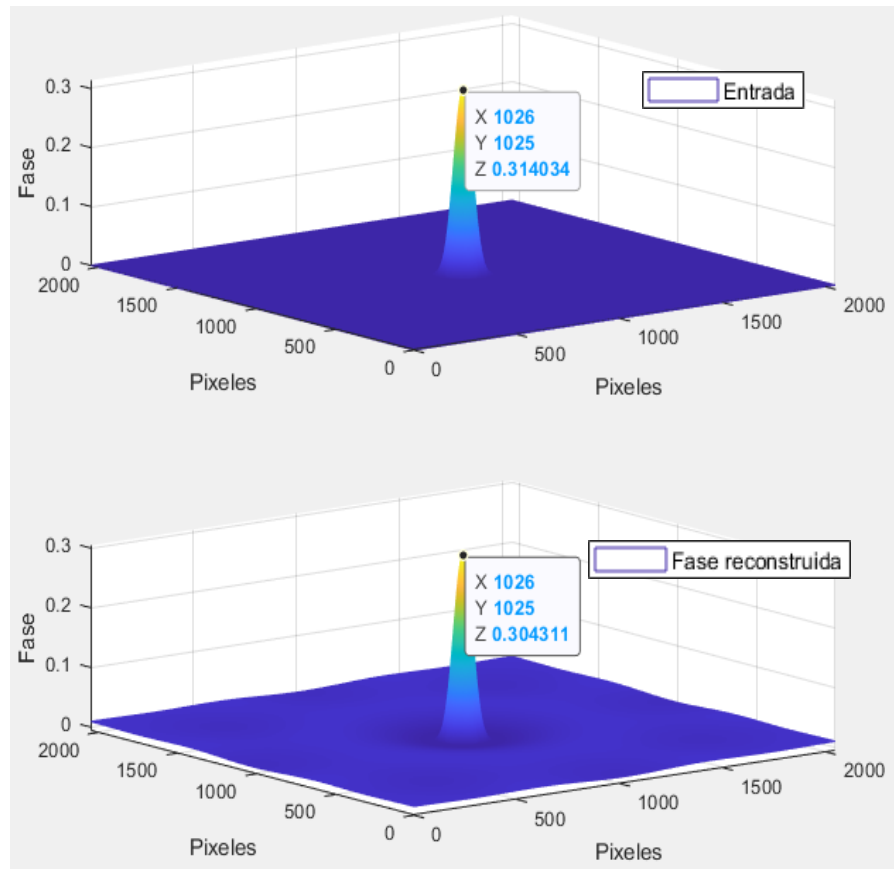
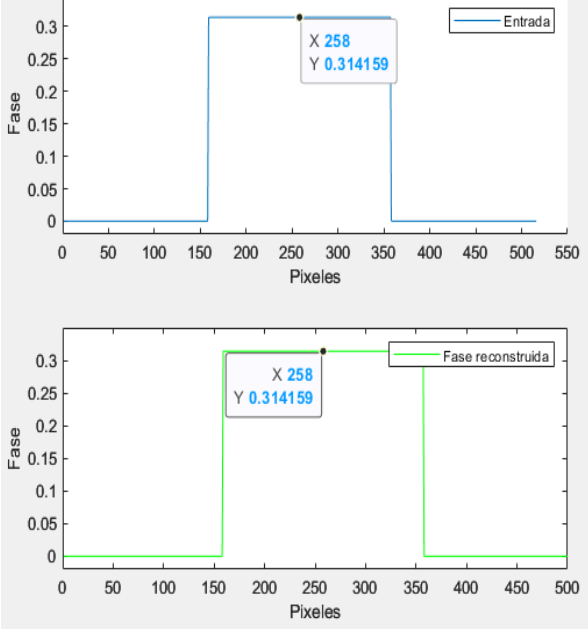
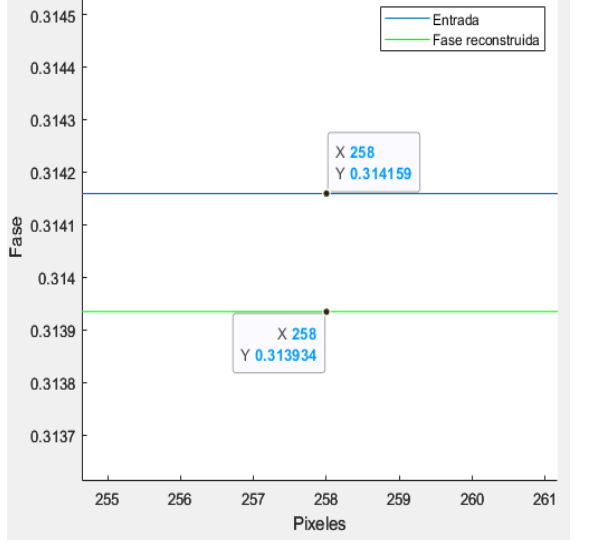
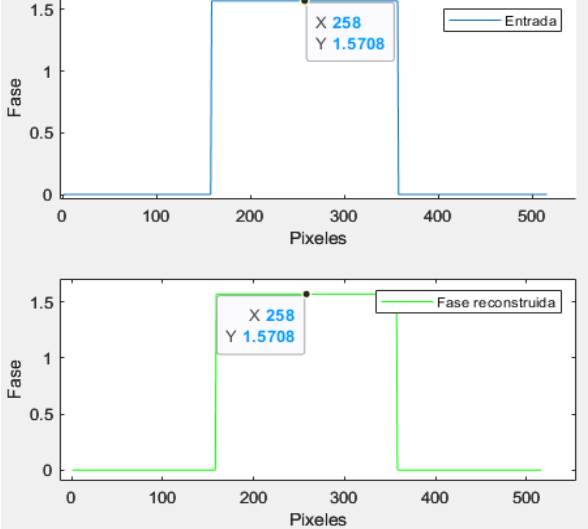
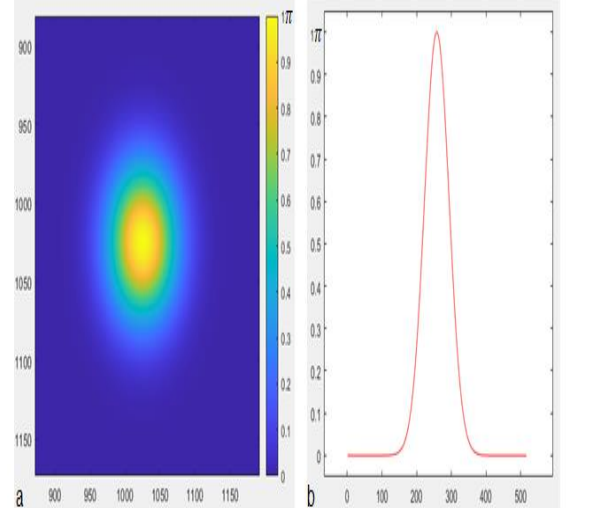


Figura 17. Deformación al incrementar el tamaño del filtro.

6.3 MÁXIMA DE FASE DEL OBJETO (BINARIO).

En la siguiente comparación (tabla 4) se usa un objeto de fase binario, podemos ver ambos métodos aplicados mientras varía la fase del objeto, con el tamaño del filtro ideal (un píxel), con fases de 0.1π y 0.5π radianes.

Tabla 4. Comparación de imágenes con variación en el tamaño de la fase del objeto binario.

Fase	Método DHM	Método FPM
<p>0.1π</p>	 <p>Error máximo: 0</p>	 <p>Error máximo: 2.25×10^{-4} rad $3.58 \times 10^{-5} \lambda$</p>
<p>0.5π</p>	 <p>Error máximo: 0</p>	 <p>Error máximo: 1.5×10^{-2} rad; $2.40 \times 10^{-3} \lambda$</p>

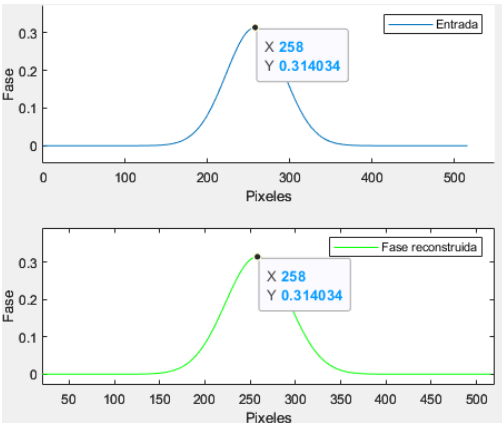
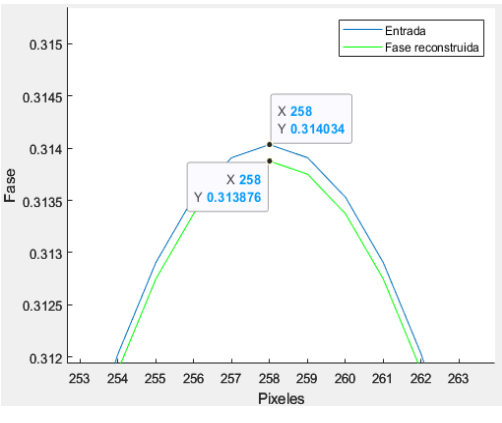
Gracias a esta comparación podemos ver que el error que se obtiene entre la fase recuperada y la fase de entrada aumenta con respecto al tamaño de la fase del objeto y en este caso el error es más grande con respecto a los errores obtenidos usando un objeto de entrada gaussiano.

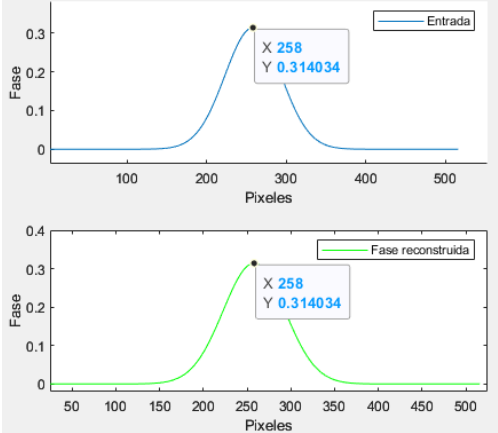
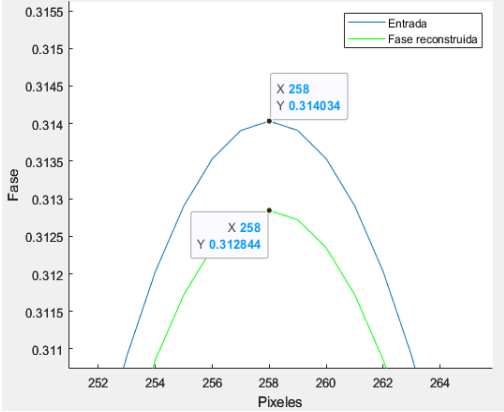
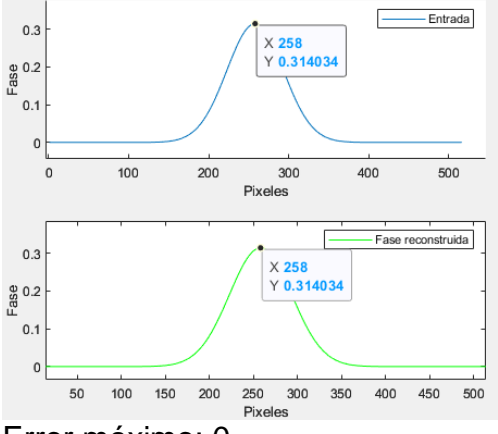
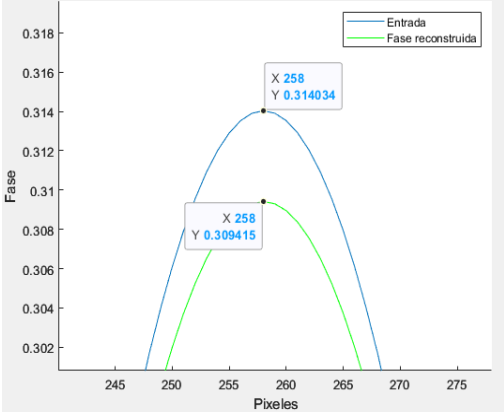
6.4 EFECTO DE LA AMPLITUD Y FASE EN AMBOS MÉTODOS (GAUSS)

Finalmente, en esta comparación vamos a ver que sucede al modificar la amplitud del objeto dejando la fase constante.

Dado como objeto de fase la campana de Gauss con valor de 0.1π , variamos el tamaño de amplitud de la función para ambos métodos, esto lo logramos mediante la función $(1 - \omega * Gauss) * \exp(i * Gauss * 0.1 * \pi)$, donde modificamos ω , y toma los valores 0.1, 0.5 y 0.8, manteniendo la fase del objeto en 0.1π como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Comparación de imágenes con variación en la amplitud en ambos métodos.

Función	Método DHM	Método FPM
$\left(1 - 0.1 e^{-\frac{(x^2+y^2)}{\omega^2}}\right) * \left(e^{i * e^{-\frac{(x^2+y^2)}{\omega^2}} * 0.1 * \pi}\right)$	 <p>Error máximo: 0</p>	 <p>Error máximo: 1.58×10^{-4} rad; $2.51 \times 10^{-5} \lambda$</p>

$\left(1 - 0.5 e^{-\frac{(x^2+y^2)}{\omega^2}}\right) * \left(e^{i * e^{-\frac{(x^2+y^2)}{\omega^2}} * 0.1 * \pi}\right)$	 <p>Error máximo: 0</p>	 <p>Error máximo: 1.19×10^{-3} rad; $1.89 \times 10^{-4} \lambda$</p>
$\left(1 - 0.8 e^{-\frac{(x^2+y^2)}{\omega^2}}\right) * \left(e^{i * e^{-\frac{(x^2+y^2)}{\omega^2}} * 0.1 * \pi}\right)$	 <p>Error máximo: 0</p>	 <p>Error máximo: 4.61×10^{-3} rad; $7.33 \times 10^{-4} \lambda$</p>

El error en el método FPM es más pequeño que al modificar el tamaño de la fase del objeto que en este caso que modificamos la amplitud, por otro lado, el método DHM no tiene errores aparentes.

CAPÍTULO 7.

CONCLUSIONES.

Las diferencias de fase que se obtienen cambian con respecto a la variable que estamos modificando, en la tabla 3, vemos el cambio en el tamaño de fase del objeto y podemos ver que, entre más grande es, la fase incrementa en promedio 1.373×10^{-3} . Entre la fase del objeto y la fase obtenida en el método FPM, existe error, aunque haya modificaciones en la variable de la fase, en comparación al método DHM donde no hay error.

Para la tabla 4, se modifica el tamaño del filtro en el método FPM, aquí podemos ver que entre más grande sea el filtro, el error incrementa en las diferencias de fase obtenidas. Es importante recalcar que el filtro en la simulación del método FPM es ideal; en la práctica este filtro puede ser difícil de lograr, por lo que los errores al obtener la diferencia de fase son probables de obtener.

Cuando trabajamos con el objeto de fase de forma gaussiana, vemos un error menor al obtener la diferencia de fase que al hacer las simulaciones con un objeto binario en el método de Microscopia de fase de Fourier. En promedio los errores con los objetos binarios son de 7.657×10^{-3} , es decir que hay una diferencia de 6.28×10^{-3} con respecto al uso de objetos de fase Gaussiana; sin embargo, para las simulaciones binarias en el método de Microscopia Holográfica Digital el error es cero, al igual que cuando se usa el objeto de fase Gaussiana; esto lo podemos ver en la tabla 5.

Por otro lado, en la tabla 6, tenemos la variación en el tamaño de amplitud en ambos métodos, para el FPM cambiar esta variable significa un error que incrementa de acuerdo con el tamaño de absorción en el objeto de fase gaussiana, en promedio 1.98×10^{-3} , sin embargo, de acuerdo con los resultados

obtenidos, podemos deducir que al método DHM no le afecta esta variación ya que el error al obtener la diferencia de fase es cero.

A continuación, se presenta la tabla 6, donde a modo de resumen podemos ver los errores máximos obtenidos en cada comparación, expresados en lambda (λ), experimentalmente lo mejor que se obtiene en error es $\lambda/100 = 0.06 \text{ rad}$, en las simulaciones los errores son en condiciones ideales.

Tabla 6. Resumen de resultados en cada comparación.

Objeto de estudio	Parámetro variado	Resultados	
	Fase		
Objeto de fase Gaussiano (máxima fase)	0.1π	$10^{-6} \lambda$	
	0.3π	$10^{-4} \lambda$	
	0.5π	$10^{-4} \lambda$	
	0.8π	$10^{-4} \lambda$	
Objeto de fase binario (máxima fase)	0.1π	$10^{-5} \lambda$	
	0.5π	$10^{-3} \lambda$	
Objetos de fase (distribución espacial)	0.1π	Gaussiano $10^{-6} \lambda$	binario $10^{-5} \lambda$
	0.5π	$10^{-4} \lambda$	$10^{-3} \lambda$
	Amplitud		
Objeto de amplitud y fase	0.1	$10^{-5} \lambda$	
	0.5	$10^{-4} \lambda$	
	0.8	$10^{-4} \lambda$	
	Área		
Tamaño del filtro	ω_0	$10^{-6} \lambda$	

	$\omega_0/10$	$10^{-5} \lambda$
	$\omega_0/3.84$	$10^{-4} \lambda$
	$\omega_0/1.72$	$10^{-3} \lambda$

Finalmente podemos concluir que el método FPM es mucho más estable. Sin embargo, es importante mencionar que este tipo de sistema es muy robusto, además idealmente el método DHM no contiene errores debido a la exactitud numérica en la solución matemática, no obstante, experimentalmente es muy sensible a pequeñas variaciones térmicas o mecánicas por ser de dos haces, por lo que se propone continuar con esta investigación de forma experimental para verificar los datos arrojados por estas simulaciones.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Ejemplos de configuraciones QPI.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Geometría de difracción.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 3. Geometría para realizar la operación de transformada de Fourier con lente positiva.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 4. interferómetros a) Mach-Zehnder, b) Michelson.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 5. Principios de QPI.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 6. Microscopía holográfica digital, interferometría Mach-Zehnder de dominio espacial.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 7. Configuración experimental HPM.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 8. Esquema de la interferometría por desplazamiento de fase: vectores de onda incidente y de referencia (k_i y k_r).....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 9. Configuración esquemática para SLIM.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 10. Sistema DRIMAPS implementado con un microscopio Horn.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 11. Sistema DRIMAPS implementado con un microscopio Jamin-Lebedeff.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 12. Configuración interferómetro de cuadratura.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 13. Configuración experimental del método FPM.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 14. Configuración DPM.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 15. Función Gaussiana.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 16. Objeto binario.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 17. Deformación al incrementar el tamaño del filtro.....</i>	<i>63</i>

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Métodos QPI generales con respecto al rendimiento del método... 39

Tabla 2. Comparación de imágenes con variación en el tamaño de la fase de objeto (Gauss). 59

Tabla 3. Comparación de imágenes con variación en el tamaño del filtro. ... 61

Tabla 4. Comparación de imágenes con variación en el tamaño de la fase del objeto binario. 64

Tabla 5. Comparación de imágenes con variación en la amplitud en ambos métodos. 65

Tabla 6. Resumen de resultados en cada comparación. 68

REFERENCIAS

- Brown, A. F., & Dunn, G. A. (1989). Microinterferometry of the movement of dry matter in fibroblasts. *Journal of Cell Science*, *92*, 379–389.
- Chatterjee, D. K., Gnanasammandhan, M. K., & Zhang, Y. (2010). Small Upconverting Fluorescent Nanoparticles for Biomedical Applications. *Small*, *24*, 2781–2795.
- Creath, K. (1988). V Phase-Measurement Interferometry Techniques. *Progress in Optics*, *26*(C). [https://doi.org/10.1016/S0079-6638\(08\)70178-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6638(08)70178-1)
- David J. Griffiths. (2013). *Introduction to electrodynamics* (Fourth). Pearson.
- DiMarzio, C. (1999). *OPTICAL QUADRATURE INTERFEROMETRY UTILIZING POLARIZATION TO OBTAIN IN-PHASE AND QUADRATURE INFORMATION* (Patent No. 5883717).
- Dyson, J. (1957). Common-Path Interferometer for Testing Purposes. *Optical Society of America*, *47*, 386–390.
- Gabor, D. (1948). A new microscopic principle. *Nature*, *777–778*.
- Gaskill, J. D. , & A. P. R. P. (1981). *Linear Systems, Fourier Transforms, and Optics*.
- Glückstad, J., & Mogensen, P. C. (2001). Optimal phase contrast in common-path interferometry. *APPLIED OPTICS*, *40*, 268–282.
- Goodman, J. W. (2005). Introduction to Fourier Optics, Third Edition. In *Optical Engineering* (Vol. 35).
- Hecht, E. (2017). Optics / Eugene Hecht. *Optics*.

-
-
- Lee, K., Kim, K., Jung, J., Heo, J., Cho, S., Lee, S., Chang, G., Jo, Y., Park, H., & Park, Y. (2013). Quantitative Phase Imaging Techniques for the Study of Cell Pathophysiology: From Principles to Applications. *Sensors*, 13, 4170–4191.
- Lu, L., Sun, J., Zhang, J., Fan, Y., Chen, Q., & Zuo, C. (2019). Quantitative phase imaging camera with a weak diffuser. *Frontiers in Physics*, 7(May). <https://doi.org/10.3389/fphy.2019.00077>
- Malacara, D. (2015). *Óptica básica* (3ra ed.). Ediciones Científicas Universitarias.
- Malacara, D., & Mallick, S. (2007). *Optical Shop Testing* (Daniel Malacara, Ed.; 3era ed.).
- Matveev, A. N. (1988). *Optics*. Mir publishers Moscow.
- Park, Y., Depeursinge, C., & Popescu, G. (2018). Quantitative phase imaging in biomedicine. *Nature Photonics*, 12, 578–589.
- Popescu, G. (2011). *Quantitative phase imaging of cells and tissues*. McGRAW_HILL.
- Popescu, G. (2017). The power of imaging with phase, not power. *Physics Today*, 34–40.
- Popescu, G., Deflores, L. P., & Vaughan, J. C. (2004). Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics. *OPTICS LETTERS*, 29, 2503–2505.
- Popescu, G., Takahiro, I., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (2006). Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics. *OPTICS LETTERS*, 31, 775–777.
- Saleh, B., & Teich, M. (2007). *Fundamentals of photonics* (2da ed.). Wiley-interscience.

Wang, Z., Millet, L., Mir, M., Ding, H., Unarunotai, S., Rogers, J., Gillette, M. U., & Popescu, G. (2011). Spatial light interference microscopy (SLIM). *Optical Society of America*, *19*, 1016–1026.

Warger, W. C., & DiMarzio, C. A. (2009). Computational signal-to-noise ratio analysis for optical quadrature microscopy. *Optical Society of America*, *17*, 2400–2422.

Zhao, M., Cho, W., Regnier, F., & Nolte, D. (2007). Differential phase-contrast BioCD biosensor. *APPLIED OPTICS*, *46*, 6196–6209.

Zicha, D., & Dunn, G. A. (1995). An image processing system for cell behaviour studies in subconfluent cultures. *Journal of Microscopy*, *179*, 11–21.