



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN COMUNICACIÓN ÓPTICA

**“MICROSCOPIA HOLOGRÁFICA DIGITAL Y SUS
APLICACIONES”**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS

OPCIÓN:

FOTONICA

PRESENTA:

ING. JOSÉ ANDRÉS AGUILERA RAMOS

ASESORES:

DR. GUSTAVO RAMÍREZ FLORES

DR. RAÚL EDUARDO BALDERAS NAVARRO

SAN LUIS POTOSI, S.L.P, SEPTIEMBRE DE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Av. Dr. Salvador Nava Mtz. S/n Zona Universitaria C.P. 78290
San Luis Potosí, S.L.P., México
Teléfono 01(444) 826-23-16 - Fax 01(444) 826-23-84

www.fc.uaslp.mx

San Luis Potosí, S.L.P, a 19 de septiembre del 2017.

Dr. José Martín Luna Rivera
*Secretario General de la
Facultad de Ciencias, UASLP
Presente,*

Dr. Ricardo Guirado López
*Secretario de Posgrado de la
Facultad de Ciencias, UASLP
Presente*

ASUNTO: Examen de Maestría
Aguilera Ramos José Andrés



POSGRADO EN
CIENCIAS
APLICADAS

Por medio de la presente hacemos de su conocimiento nuestra aceptación para participar como jurado en el examen de grado de Maestría en Ciencias Aplicadas del estudiante **José Andrés Aguilera Ramos** Así mismo, le informamos que hemos leído el contenido de la tesis; "**Microscopia Holográfica Digital y sus aplicaciones**". Consideramos que cumple con los requisitos y calidad necesarios para que sea defendida su tesis en un examen final y la presente el próximo 27 de septiembre del 2017 a las 18:00 Hrs, en el Auditorio del Instituto de Comunicación Óptica-UASLP.

Atentamente:

Dr. Gustavo Ramírez Flores (*Asesor*)

Dr. Raúl E. Balderas Navarro (*Asesor*)

Dra. Amparo Rodríguez Cobos (*Sinodal*)

Dr. Miguel Ángel Bello Jiménez (*Sinodal*)

Dr. Luis Felipe Lastras Martínez (*Sinodal*)



FACULTAD
DE CIENCIAS

Av. Dr. Salvador Nava Martínez S/N
Zona Universitaria • CP 78290
San Luis Potosí, S.L.P., México
tel. (444) 826 2316 y 2321
fax 826 2384
www.uaslp.mx

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, así como a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Investigación en Comunicación Óptica en donde desarrolle mis capacidades como estudiante y como ser humano. También al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de la beca para poder llevar a cabo mis estudios en la maestría.

Un especial agradecimiento al Dr. Gustavo por haberme guiado y apoyado durante mi formación como estudiante y por su gran devoción y fascinación por la ciencia en especial en el área de óptica. Al Dr. Raúl Balderas por el apoyo en sugerencias y materiales que fueron de gran importancia en este trabajo y su interés por este tema de tesis. También a la Dra. Amparo quien siempre mostró su apoyo incondicional durante mi desarrollo como su estudiante. A Dr. Bello y Dr. Luis Felipe por su interés en este proyecto de tesis.

A mis amigos y compañeros de clase Abraham, Ibarra, Daniel Sánchez Vásquez, Daniel Sánchez López, Jassiel, Luis, Miriam, Eduardo Tovar, Karla, Oliver, Esdras, Adán, Cigarrillo, Gabriela, Roberto Nava, Christian Navarro, Santiago, Kristian Sandoval, Nick con los que en mi estancia en el IICO compartieron su amistad, experiencias y buenos momentos.

Al personal del IICO y de la biblioteca, a Panchito y al personal de Taller Mecánico del IICO.

GRACIAS

Dedicatoria

A:

Mi padre José Antonio Aguilera y mis hermanos Abraham Antonio y José Antonio por ser los pilares fundamentales en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Mi madre Martha Elena Ramos, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaste.

Resumen

La holografía es una técnica para producir imágenes en tres dimensiones lo que lo diferencia de la fotografía convencional, esto es posible al grabar y revelar una placa fotosensible un holograma, formado a partir de la interacción de dos ondas de luz coherente una que es el frente de onda objeto y la otra una onda de referencia [1]. Por esta invención D. Gabor recibió el Premio Nobel de Física en 1971. En la actualidad el proceso de grabado y revelado se han sustituido por una cámara digital y un método de reconstrucción numérico por computadora para el procesamiento de un holograma digital. Con esto surgió una gran expansión en investigaciones en muchas universidades y laboratorios privados alrededor del mundo. Esto se le conoce hoy en día como holografía digital. Con la holografía digital somos capaces de reconstruir el frente de onda objeto a partir de un procesado de datos y obtener datos de manera directa de intensidad y fase. Un área de interés para los investigadores es la microscopía holográfica digital con esta técnica se puede obtener imágenes en alta definición y además procesar un holograma digital de manera rápida y eficiente para el estudio de micropartículas, estructuras semiconductoras y microorganismos. El propósito de este trabajo es el desarrollo de un microscopio holográfico digital para dar aplicación en áreas de ciencias de materiales y biología. Esto se hizo utilizando un arreglo experimental en reflexión implementando un interferómetro Michelson. El método de espectro angular fue usado para la reconstrucción numérica de los hologramas digitales teniendo la ventaja de una rapidez de procesado de datos y poder tener acceso a las frecuencias espaciales en el dominio Fourier para aplicar filtraje espacial. Con los datos de la reconstrucción del frente de onda se pudo estudiar las propiedades espaciales en muestras inorgánicas/orgánicas.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Ideas básicas	1
1.2 El propósito del presente trabajo	2
2. Fundamentos teóricos de la holografía y difracción	4
2.1 Holografía.....	4
2.2 Grabado y reconstrucción de un holograma	5
2.3 Difracción	9
2.3.1 La integral de difracción de Fresnel-Kirchhoff	10
2.3.2 La integral de difracción de Fresnel	13
2.3.3 La aproximación de Fraunhofer	14
2.3.4 Espectro angular de ondas planas	15
3. Microscopía holográfica digital.....	17
3.1 Holografía digital	17
3.1.1 Técnicas para la reconstrucción numérica de hologramas digitales.....	17
3.1.2 Aplicaciones de la holografía digital	18
3.2 Microscopía holográfica digital.....	19
3.2.1 Interferómetros para MHD	20
3.3 Trabajo de tesis en MHD.....	21
3.3.1 Montaje experimental	22
3.3.2 Cámara CMOS	24
3.3.3 Láser	24

3.3.4 Reconstrucción de hologramas digitales por espectro angular.....	25
3.3.4.1 Curvatura en el plano de cámara C.....	26
3.3.4.2 Corrección de curvatura en el plano de cámara.....	27
3.3.4.3 Espectro angular y filtraje espacial.....	29
3.3.4.4 Reconstrucción de hologramas en el espacio objeto y espacio imagen	31
3.2.4.5 Reconstrucción de intensidad y fase.....	32
3.3.4.6 Reconstrucción de un holograma digital con la técnica propuesta.....	33
3.4 Modulación de Fase.....	34
3.4.1 Holografía de multi-longitud de onda	35
3.4.2 Desenvolvimiento de fase por dos longitudes de onda	36
3.4.3 Simulación para el desenvolvimiento por dos longitudes de onda.....	36
4. Instrumentación virtual	38
4.1 Introducción a LabView	38
4.2 Introducción a NI Vision	39
4.2.1 Tipos de Imagen	40
4.3 Resolución	41
4.3.1 Resolución de un objetivo de microscopio.....	42
4.3.2 Resolución de imagen.....	42
4.3.3 Resolución experimental	44
4.4 Programación en LabView	45
4.4.1 Diagrama de flujo de los programas.....	45
4.4.2 Adquisición y procesado de un holograma digital	48
4.5 Ajuste de parámetros	53
4.5.1 Magnificación lateral.....	54

4.5.2. Corrección de curvatura.....	55
4.5.3. Propagación de un plano C' a un plano optimo P'	57
5. Desarrollo de aplicaciones y resultados	61
5.1 Aplicaciones en HD y en MHD.....	60
5.2 Tarjeta de resolución USAF	63
5.2.1 Tarjeta de calibración para microscopía óptica	63
5.2.2 Proceso de reconstrucción del holograma digital	63
5.2.3. Resultados.....	64
5.2.4. Análisis de resultados y conclusiones	66
5.3 Antena Dipolo	67
5.3.1 Qué es y cuál es su aplicación?	67
5.3.2 Proceso de reconstrucción del holograma digital	68
5.3.3. Resultados.....	71
5.3.4. Análisis de resultados y conclusiones	73
5.4 Estructuras GaP	75
5.4.1 Importancia de los materiales semiconductores	75
5.4.2 Aproximación de índice de refracción efectivo.....	76
5.4.3 Proceso de reconstrucción de los hologramas digitales de GaP.....	78
5.4.4 Resultados.....	82
5.4.5 Análisis de resultados y conclusiones	86
5.5 Níquel/Silicio.....	88
5.5.1 Estructura Níquel /Silicio	88
5.5.2 Proceso de reconstrucción del holograma digital	89
5.5.3 Resultados.....	91

5.5.4	Análisis de resultados y conclusiones	92
5.6	Epidermis de la cebolla.....	94
5.6.1	Los alcances de la MHD en biología.....	94
5.6.2	Proceso de reconstrucción del holograma digital	95
5.6.3	Resultados.....	97
5.6.4	Análisis de resultados y conclusiones	98
5.7	Célula epitelial de la mucosa	99
5.7.1	La MHD y técnicas de contraste de fase para el estudio de microorganismos .	99
5.7.2	Célula de la mucosa y preparación de la muestra.....	99
5.7.3	Proceso de reconstrucción del holograma digital	101
5.7.4	Resultados.....	103
5.7.5	Análisis de resultados y conclusiones	105
6.	Conclusiones.....	106
	Apéndices.....	109
	Referencias	130

Capítulo 1

Introducción

1.1 Ideas básicas

Con el desarrollo e innovación en las tecnologías de la información, se abrió la puerta a diversas y a vastas investigaciones científicas alrededor del mundo, entre ellas encontramos a la holografía digital que es de gran interés para la investigación científica y el desarrollo de aplicaciones. En esta área de interés es conformada por dos palabras “holografía” y “digital” donde la primera es la técnica para producir imágenes en 3D y la segunda se refiere al procesamiento de datos mediante dígitos por medio de una computadora.

La holografía digital da amplias posibilidades a desarrollo a numerosas aplicaciones y a todo tipo de investigación en diferentes áreas de las ciencias naturales, esto es posible debido a que el método ofrece flexibilidad a toda clase de montajes experimentales en los laboratorios en universidades o laboratorios privados alrededor del mundo y además ofrece la manipulación de datos experimentales obtenidos al procesar la información en una computadora de manera rápida y eficiente.

Una de las aplicaciones más reconocidas de la holografía digital es la microscopía holográfica digital en donde se combina las capacidades de la holografía digital con microscopía óptica, esta combinación de técnicas resulta ser atractiva y con un gran potencial para realizar investigación y el desarrollo aplicaciones. La microscopía holográfica digital ha sido de

espacial interés para la investigación en áreas como la botánica, microbiología, medicina, materiales, entre otros muchos.

1.2 Propósito del presente trabajo

Uno de los problemas de la holografía análoga era el grabado de un único holograma en una placa fotosensible, para ser sometida a un proceso de revelado por medio de químicos esto imposibilitaba a ser considerada una técnica para a ser investigación científica debido a su propia naturaleza procesado. Con la integración y el desarrollo de tecnologías de cámaras digitales tipo CCD y CMOS el proceso de grabado y revelado fueron sustituidos por proceso de registro de manera digital y poder procesar esta información y lograr una reconstrucción numérica en un procesador en una computadora, eventualmente la holografía se encuentra hoy en día empleada como herramienta para las diversas investigaciones alrededor del mundo.

El propósito de este trabajo es la elaboración de un microscopio que trabaje en base a la microscopía holográfica digital. El modo de trabajo del microscopio será por reflexión, con ello se realizó estudios a diferentes muestras en áreas como materiales y biología, obteniendo información relevante a partir de estas como intensidad y fase del frente de onda de la luz reflejada. Con esta información se realizó un análisis cuantitativo de las propiedades espaciales de la muestra.

Se utilizó un interferómetro de Michelson con óptica para microscopía para generar los hologramas digitales. Cada holograma se registra de manera digital por medio de una cámara para ser procesado en una computadora. El método de reconstrucción del holograma fue el método espectro angular, el cual ofrece dos ventajas; acceso al espectro de frecuencias

espaciales para poder realizar filtraje espacial y rapidez de procesamiento de datos. El software usado es NI LabView 2015 SP1 y se usó además el módulo NI Vision que es una librería integrada a LabView para procesamiento de imágenes digitales.

Para tener la mejor comprensión de los temas en general se comenzará con los conceptos básicos de la holografía, como el proceso de grabado y el proceso de reconstrucción. Además, se revisará el marco teórico del fenómeno de la difracción de la luz. Todo esto será abarcado en el capítulo 2.

En el capítulo 3 se comienza con el tema inicial de holografía digital para dirigirlo al tema central de este trabajo: microscopía holográfica digital. En este capítulo se describirá el montaje experimental implementado para el registro de los hologramas digitales y la técnica de reconstrucción numérica por espectro angular. Para finalizar este capítulo se abarca el tema de modulación de fase en holografía digital.

El capítulo 4 se describirá la programación del instrumento virtual desarrollado en LabView y se revisará algunos conceptos básicos de la adquisición y manejo de imágenes digitales.

El desarrollo de experimentos y los resultados de estos son mostrados en el capítulo 5, en donde se exploran diversas aplicaciones que tiene el instrumento desarrollado en este trabajo.

Para finalizar se muestran las conclusiones finales de este trabajo de tesis en el capítulo 6.

Capítulo 2

Fundamentos teóricos de la holografía y difracción

2.1 Holografía

En 1948 Dennis Gabor propuso una novedosa técnica de procesado de imágenes a la que llamo reconstrucción de frente de onda la cual conocemos hoy en día como holografía.

Gabor descubrió que cuando luz coherente de un haz de referencia está presente de junto a luz proveniente de un objeto, la información de intensidad y fase puede ser grabada en un medio fotosensible. Cuando se ilumina el medio de grabado con el mismo haz de referencia se puede recuperar el frente de onda completo del objeto [1].

El demostró que de un patrón de interferencia (Holograma) podemos recuperar la información de intensidad y fase. En 1971 Gabor recibió el Premio Nobel de Física por esta invención [2,3].

Gracias a los avances tecnológicos es posible registrar un holograma de manera digital en una cámara CCD o CMOS sustituyendo la placa fotosensible, para poder procesarlo de manera numérica en un equipo de cómputo. Así teniendo numerosas aplicaciones en las ciencias naturales esta técnica se le conoce hoy en día como holografía digital.

2.2 Grabado y reconstrucción de un holograma

El grabado de un holograma se logra debido a la interacción de luz coherente proveniente de dos frentes de onda uno haz de referencia y otro haz objeto, donde interfieren en el plano holograma $U_H(x, y, 0)$, en este plano se graba un patrón de franjas de interferencia en una placa fotosensible.

El patrón de franjas de interferencia es el resultado del fenómeno de interferencia óptica cual es producida por la interacción de dos o más ondas de luz coherente que producen un patrón de irradiancia resultante de mayor, menor o igual amplitud [3]. Para el grabado de un holograma el fenómeno de interferencia juega un importante debido a que el patrón de interferencia es formado a partir de dos ondas una de onda de referencia y una onda objeto como se muestra en la Figura 2.00.

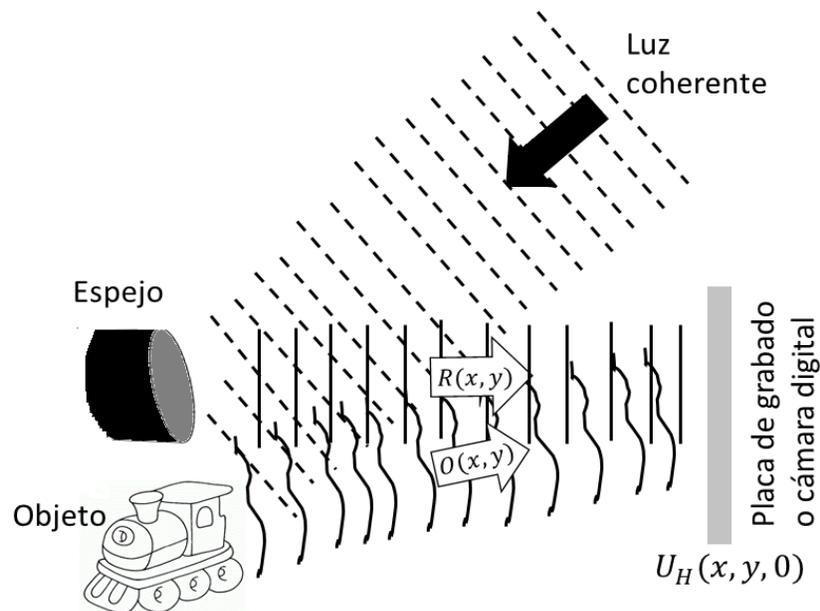


Figura 2.00. Grabado de un holograma.

La reconstrucción de frente de onda se produce al iluminar el holograma con el mismo haz de referencia, para obtener luz difractada causada por el patrón de interferencia grabado en

la placa. Con la luz difractada del holograma se formarán dos imágenes, una de ellas es la imagen virtual (+1) que es la onda que emerge desde la posición original del objeto, un observador posicionado en cierto ángulo observara el objeto de manera tridimensional. Mientras que la otra imagen se forma a partir de una onda que converge, esta onda formara una imagen real distorsionada (-1) y se formara de manera opuesta a la posición real del objeto [3,4]. Vea todo esto en la Figura 2.01.

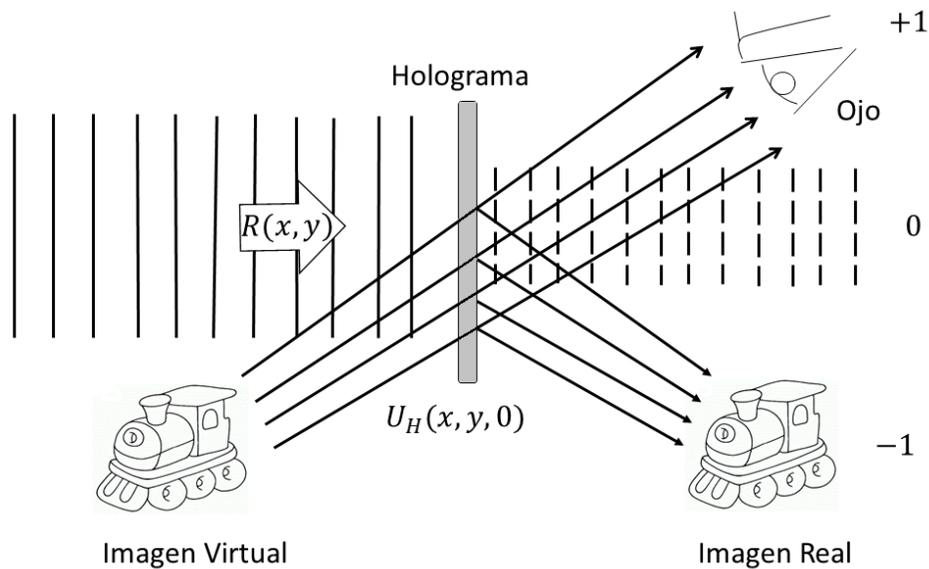


Figura 2.01. Reconstrucción de un holograma.

Para el análisis matemático, se representa la onda objeto y la onda referencia con notación de amplitud compleja:

$$O(x, y) = |O(x, y)|e^{-i\varphi_O(x,y)}, \quad (1)$$

$$R(x, y) = |R(x, y)|e^{-i\varphi_R(x,y)}. \quad (2)$$

La intensidad resultante en plano holograma se describe en términos de una onda de objeto y una onda referencia [5]:

$$I(x, y) = |O(x, y) + R(x, y)|^2 = O^2(x, y) + R^2(x, y) + O(x, y)R^*(x, y) + O^*(x, y)R(x, y). \quad (3)$$

Sustituyendo (1) y (2) en (3) podemos describir la intensidad de la siguiente manera:

$$I(x, y) = |O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2 + 2|R(x, y)||O(x, y)| \cos[\varphi_O(x, y) - \varphi_R(x, y)]. \quad (4)$$

El primer término corresponde a lo que registra una cámara fotográfica del objeto por medio de su lente, el segundo término es un fondo constante debido a la iluminación de haz de referencia, mientras el tercer término y el más importante corresponde a la interferencia de dos ondas, contiene toda la información del frente de onda objeto ya que se hallan presentes tanto $|O(x, y)|$ y $\varphi_O(x, y)$. El grabado o el registro digital de este patrón de interferencia constituye un holograma o un holograma digital.

Para un análisis riguroso consideremos que la onda objeto es una onda plana de componentes de Fourier y que viaja en dirección según a las distintas frecuencias espaciales del campo luminoso del objeto [3].

Cada onda plana de Fourier proveniente del objeto interfiere en el plano holograma con la onda plana de referencia, así guardando la información de cada frecuencia espacial en forma de un patrón de franjas vea Figura 2.02.

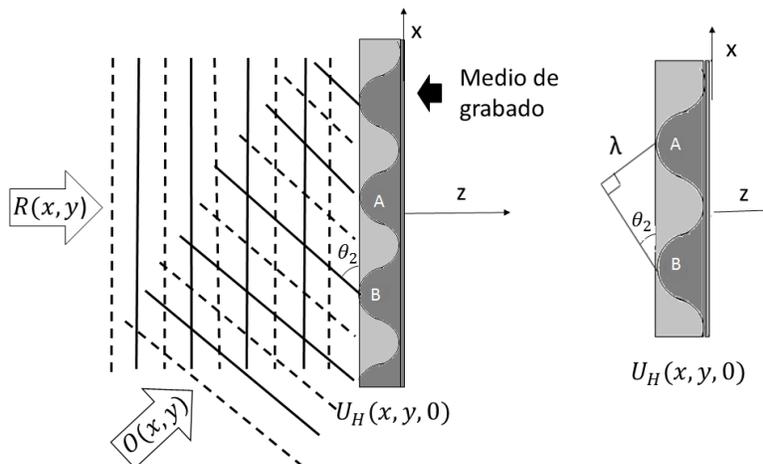


Figura 2.02. Patrón de interferencia debido a dos ondas planas.

Definiendo a $R(x, y)$ como una onda plana que se desplaza de manera perpendicular al plano holograma en dirección z :

$$R(x, y) = |R(x, y)|e^{-i2\pi a_1 x} = |R(x, y)|, \quad (5)$$

donde $a_1 = \frac{\sin \theta_1}{\lambda}$, $\theta_1 = 0$ y $O(x, y)$ es una onda plana que incide con un ángulo θ_2 :

$$O(x, y) = |O(x, y)|e^{-i2\pi a_2 x}, \quad (6)$$

donde $a_2 = \frac{\sin \theta_2}{\lambda}$. Aplicando la ecuación 4, la intensidad toma forma:

$$I(x, y) = 2|A(x, y)|^2(1 + \cos[2\pi a_2 x]), \quad (7)$$

donde las amplitudes $|A(x, y)| = |R(x, y)| = |O(x, y)|$. La ecuación 7 muestra que la irradiancia describe un patrón cosenoidal a lo largo de x en el plano holograma, además la fase varia con respecto a x [3]. Al iluminar el holograma con el mismo haz de luz de referencia podemos difractar las componentes de Fourier +1, 0, -1 a causa del patrón cosenoidal grabado en la placa fotosensible vea esto en la Figura 2.03 [6].

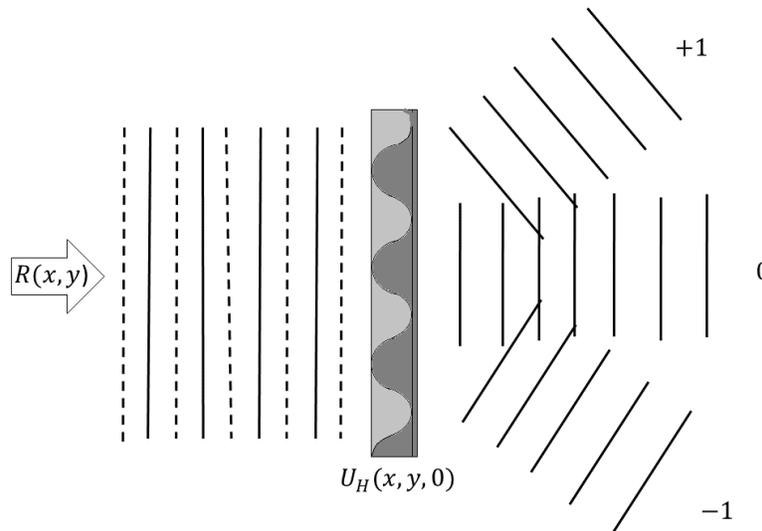


Figura 2.03. Componentes de Fourier +1, 0, -1 difractados debido al iluminar un holograma que contiene un patrón cosenoidal producto de la interferencia.

2.3 Difracción

El fenómeno conocido como difracción juega un rol importante en la reconstrucción del frente de onda en holografía y se emplea el modelo matemático para la reconstrucción numérica de hologramas digitales en holografía digital de ahí su estudio e importancia.

La primera referencia histórica de difracción apareció en el trabajo de Leonardo da Vinci en el Renacimiento [7]. La primera descripción del fenómeno fue hecha por Francesco Grimaldi en el siglo XVII denotándolo como *diffraetio*. Las observaciones de Grimaldi indican la transición de franjas brillantes a oscuras de manera gradual a lo largo de una pantalla. Este fenómeno de la luz no se podía describir bajo la teoría ondulatoria de la luz de la época [3].

La primera evolución de la teoría ondulatoria de la luz fue hecha por Christian Huygens donde expresaba que cada punto de un frente de onda puede visualizarse como una fuente de trenes de onda esféricos secundarios, aunque esto no puede explicar de una manera satisfactoria el proceso de difracción. En 1804 Thomas Young reforzó la teoría ondulatoria de luz introduciendo el término interferencia.

En 1818 Augustin Jean Fresnel postulo que las ondas secundarias del principio de Huygens interferían mutuamente entre sí [2]. El principio de Huygens combinado con el término interferencia fue llamado como principio Huygens-Fresnel.

Gustav Kirchhoff desarrollo una teoría más rigurosa basándose directamente la solución de la ecuación de onda derivada de las ecuaciones de Maxwell. Este análisis refinado de Kirchhoff llevo a una formulación precisa del principio de Huygens esto debido a que su formulación se derivó de la ecuación de onda.

Aunque la teoría de Kirchhoff es una aproximación solo es válida para longitudes de onda pequeñas a comparación de la abertura. Las soluciones de esta teoría se obtienen solo en casos especiales debido a las condiciones que impone la obstrucción.

La teoría Kirchhoff funciona bien, aunque se ocupe solo de ondas escalares y sea insensible al hecho que la luz es un campo vectorial transversal [3].

2.3.1 La integral de difracción de Fresnel-Kirchhoff

Si una apertura Σ es iluminada por una sola onda esférica:

$$U(P_1) = \frac{Ae^{ikr_{21}}}{r_{21}}. \quad (8)$$

Esta onda esférica que emerge desde un punto P_2 a una distancia r_{21} en P_1 y P_0 es el punto de observación como se muestra en la Figura 2.04.

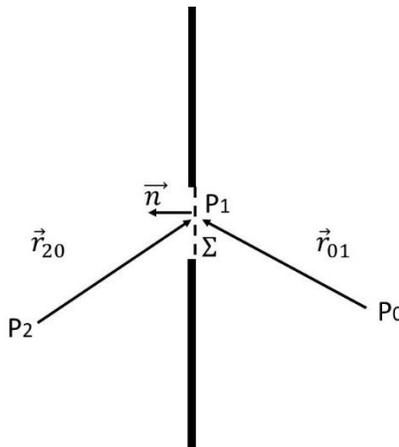


Figura 2.04. Geometría de la fórmula de la integral de Fresnel-Kirchhoff.

La integral Fresnel-Kirchhoff queda definida [2]:

$$U(P_0) = \frac{A}{i\lambda} \iint_{\Sigma} \frac{e^{ik(r_{21}+r_{01})}}{r_{21}r_{01}} \left[\frac{\cos(\vec{n}, \vec{r}_{01}) - \cos(\vec{n}, \vec{r}_{21})}{2} \right] ds. \quad (9)$$

Esta integral describe el campo que se difracta debido a la abertura a un punto P_0 .

La integral Fresnel-Kirchhoff puede ser interpretada bajo el principio de Huygens si consideramos que la superficie de integración toma forma de una capa esférica [8]. Esto se muestra en la Figura 2.05.

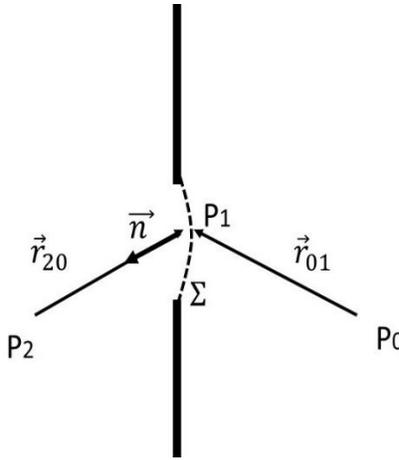


Figura 2.05. Reinterpretación de la de la integral de Fresnel-Kirchhoff.

Ente caso particular r_{21} es una constante, o sea $\cos(\vec{n}, \vec{r}_{21}) = -1$. La integral Fresnel-Kirchhoff toma forma:

$$U(P_0) = \frac{1}{i\lambda} \iint_{\Sigma} U(P_1) \frac{e^{ikr_{01}}}{r_{01}} \left[\frac{\cos(\vec{n}, \vec{r}_{01}) + 1}{2} \right] ds. \quad (10)$$

La interpretación es $U(P_1)$ es la amplitud compleja de la onda primaria incidente a la abertura. De la onda primaria cada elemento ds de la abertura emerge una onda esférica secundaria $U(P_1) \frac{e^{ikr_{01}}}{r_{01}} ds$. La perturbación óptica total que percibe P_0 es obtenida sumando las ondas esféricas de cada elemento ds .

El principio de Huygens-Fresnel como lo predice la primera solución Rayleigh-Sommerfel se puede expresar de manera general como [2]:

$$U(P_0) = \frac{1}{i\lambda} \iint_{\Sigma} U(P_1) \frac{e^{ikr_{01}}}{r_{01}} \cos \theta \, ds. \quad (11)$$

En la Figura 2.06 se muestra la geometría del principio de Huygens-Fresnel, el plano de abertura está en coordenadas (ξ, η) y es iluminado en la dirección z positivo, el plano de difracción está en coordenadas (x, y) .

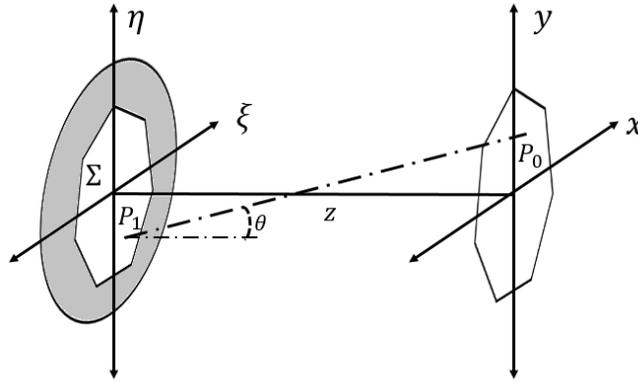


Figura 2.06. Geometría de difracción del principio Huygens-Fresnel.

El principio Huygens-Fresnel en coordenadas rectangulares toma la siguiente forma:

$$U(x, y) = \frac{z}{i\lambda} \iint_{\Sigma} U(\xi, \eta) \frac{e^{ikr_{01}}}{r_{01}^2} d\xi d\eta, \quad (12)$$

en donde el valor de r_{01} está dado por :

$$r_{01} = \sqrt{z^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2}. \quad (13)$$

2.3.2 La integral de difracción de Fresnel

Para reducir la integral del principio de Huygens-Fresnel de manera simple se realiza una aproximación binomial en la distancia r_{01} . La expansión binomial está dada por:

$$\sqrt{1+b} = 1 + \frac{1}{2}b - \frac{1}{8}b^2 + \dots, . \quad (14)$$

Factorizando z en r_{01} queda:

$$r_{01} = z\sqrt{1 + \left(\frac{x-\xi}{z}\right)^2 + \left(\frac{y-\eta}{z}\right)^2}. \quad (15)$$

Solo se quedan los primeros dos términos de la expansión binomial:

$$r_{01} \approx z \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{x-\xi}{z} \right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{y-\eta}{z} \right)^2 \right]. \quad (16)$$

Para el término r_{01}^2 que aparece en el denominador de la ecuación 12 solo nos quedamos con el primer término de la expansión binomial y es aceptable ya que induce un error pequeño al cortar términos de la expansión de manera que la integral toma forma de:

$$U(x, y) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} \iint_{-\infty}^{+\infty} U(\xi, \eta) e^{i\frac{k}{2z}[(x-\xi)^2 + (y-\eta)^2]} d\xi d\eta. \quad (17)$$

Desarrollando los binomios y factorizando el término $e^{i\frac{k}{2z}(x^2+y^2)}$ afuera de la integral. La integral de difracción de Fresnel queda definida como:

$$U(x, y) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{i\frac{k}{2z}(x^2+y^2)} \iint_{-\infty}^{+\infty} \left\{ U(\xi, \eta) e^{i\frac{k}{2z}(\xi^2+\eta^2)} \right\} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}(x\xi+y\eta)} d\xi d\eta, \quad (18)$$

donde la integral define una transformada de Fourier de la función compleja de la apertura $U(\xi, \eta)$ multiplicada por un factor exponencial de fase cuadrático.

Podemos reescribirla como:

$$U(x, y) = C \mathcal{F} \left\{ U(\xi, \eta) e^{i\frac{k}{2z}(\xi^2 + \eta^2)} \right\} \quad (19)$$

o

$$U(x, y) \propto \mathcal{F} \left\{ U(\xi, \eta) e^{i\frac{k}{2z}(\xi^2 + \eta^2)} \right\}. \quad (20)$$

2.3.3 La aproximación de Fraunhofer

En la integral de Fresnel el campo difractado $U(x, y)$ es la transformada de Fourier de la multiplicación de la función apertura con un factor exponencial de fase cuadrado y si además a esto se impone la siguiente condición:

$$z \gg \frac{k(\xi^2 + \eta^2)_{MAX}}{2}, \quad (21)$$

donde implica que z está en el campo lejano o región de difracción de Fraunhofer la integral de difracción toma la forma:

$$U(x, y) = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{i\frac{k}{2z}(x^2 + y^2)} \iint_{-\infty}^{+\infty} U(\xi, \eta) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda z}(x\xi + y\eta)} d\xi d\eta. \quad (22)$$

Podemos reescribirla como:

$$U(x, y) = C \mathcal{F}\{U(\xi, \eta)\} \quad (23)$$

o

$$U(x, y) \propto \mathcal{F}\{U(\xi, \eta)\}. \quad (24)$$

Donde la distribución de campo difractado $U(x, y)$ en la difracción de Fraunhofer es la transformada de Fourier de la distribución de amplitud compleja $U(\xi, \eta)$ de la abertura Σ .

2.3.4 Espectro angular de ondas planas

Una alternativa para describir la difracción es el método de espectro angular o descomposición de ondas planas [2,4,8,9].

Dado un campo complejo de la abertura $U(\xi, \eta, z = 0)$. El espectro angular del campo de la abertura está dado por:

$$A_0(k_x, k_y; 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} U(\xi, \eta, 0) e^{-i2\pi(k_x\xi + k_y\eta)} d\xi d\eta. \quad (25)$$

El espectro angular describe las amplitudes de las ondas planas componentes del campo complejo en $z=0$, $U(\xi, \eta, 0)$ esto es acorde a una propiedad básica de la transformada de Fourier.

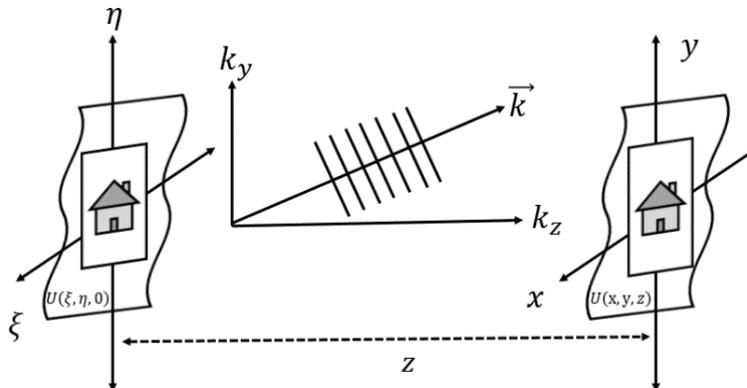


Figura 2.07. Propagación de un componente de una onda plana por espectro angular.

El exponente $e^{-i2\pi(k_x\xi+k_y\eta)}$ representa las funciones armónicas elementales en el plano (ξ, η) de una onda plana que se propaga con vector de onda $\vec{k} = (k_x, k_y, k_z)$ vea la Figura 2.07 en donde:

$$k_z = \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}. \quad (26)$$

En la propagación del espectro angular, a lo largo de z , se puede demostrar que corresponde a un factor $e^{ik_z z}$ [2]:

$$A(k_x, k_y, k_z) = A_0(k_x, k_y; 0)e^{ik_z z}. \quad (27)$$

Una observación importante el factor interno de la raíz cuadrada en k_z debe cumplir:

$$k_x^2 + k_y^2 \leq k^2. \quad (28)$$

Lo cual se impone un filtro pasa bajos en las frecuencias espaciales de entrada.

De manera que el campo difractado en $U(x, y, z)$ queda:

$$U(x, y, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} A(k_x, k_y, k_z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y. \quad (29)$$

Para el método espectro angular la difracción se calcula a partir de la descomposición de ondas planas que viajan a través del espacio, mientras que el principio de Huygens y la teoría de Rayleigh-Sommerfel se construyen a partir del comportamiento de ondas esféricas que emergen de fuentes puntuales lo cual implica singularidades [8].

Capítulo 3

Microscopía Holográfica Digital

3.1 Holografía Digital

La holografía digital es una nueva tecnología de procesado de imágenes que adquiere las capacidades de la holografía, pero da nuevas soluciones a problemas que han estado limitando su aplicación y desarrollo. Al remplazar los procesos de revelado con imágenes digitales y tener la posibilidad de acceder al campo óptico complejo, se tiene un gran rango de técnicas para obtener un campo complejo difractado obtenido por la reconstrucción numérica de un holograma en una computadora [5,10,11]. En los últimos años las actividades científicas como la investigación en holografía digital han estado creciendo y en especial las áreas relacionadas en la biología [12].

3.1.1 Técnicas para la reconstrucción numérica de hologramas digitales

En holografía digital existen diversas técnicas para obtener el campo complejo del frente de onda, a partir de la reconstrucción numérica derivada de un método que describe la difracción de la luz. Las técnicas de reconstrucción numérica más utilizadas son [10,13]:

- Reconstrucción por aproximación de Fresnel.
- Reconstrucción por la aproximación de convolución.
- Método espectro angular.

Partiendo de la integral de difracción de Fresnel-Kirchhoff y aplicando una aproximación binomial se deriva la reconstrucción por aproximación de Fresnel y semejantemente el método por convolución solo utilizando el teorema de convolución, eventualmente esta aproximación es mucho más rápida y eficiente computacionalmente. El tercer método espectro angular es igualmente rápida en procesado de computo, pero goza la ventaja de obtener acceso al espectro de frecuencias espaciales para aplicar técnicas filtrado espacial en el dominio de Fourier [14,15].

3.1.2 Aplicaciones de la holografía digital

Con la reciente desarrollo tecnológico de computadoras y cámaras CCD o CMOS, la holografía digital es propuesta como solución a diversos problemas de la holografía convencional. El proceso de reconstrucción numérica permite el análisis cuantitativo de intensidad y fase del frente de onda, esto brinda numerosas posibilidades a diversas aplicaciones. En holografía digital interferométrica (HDI) y en microscopía holográfica digital (MHD) son áreas destacadas de aplicación en la holografía digital [5,8,16].

La holografía digital tiene el potencial de obtener cantidades físicas medibles y a diferencia de otras técnicas medición, entre muchas otras esta goza de las siguientes ventajas [16]:

- Rápido procesamiento de datos para monitoreo de la información en tiempo real [5].
- Flexibilidad en arreglo óptico ya sea por reflexión o transmisión, o en arreglos en línea o fuera de eje [10].
- Mejoras en los montajes experimentales, así como los algoritmos de reconstrucción numérica.
- Aplicaciones en el cifrado de información.

- Aplicaciones en el seguimiento de partículas y holografía subacuática [5].
- Las mediciones de altura son de no contacto y no invasivos, por lo cual no es necesario usar puntas que puedan afectar de manera física a las muestras, en holografía digital solo se ven afectados por intensidad de luz [8,17].
- La intensidad de luz generalmente es de muy baja potencia para causar daño a la muestra incluso para una muestra biológica.
- Posibilidad de obtener mediciones de deformación provocado por esfuerzo o tensión en materiales en estudio en HDI [16].
- Las diversas muestras en estudio pueden tener forma o relieve de forma arbitraria.
- En HDI es casi independiente del estado de la materia: se pueden obtener deformaciones de materiales duros y blandos y además se pueden determinar variaciones de índices de refracción en sólidos, fluidos y en gases [16].
- Diversas aplicaciones en microbiología debido la obtención de imágenes de contraste de fase de muestras biológicas como células sin necesidad de aplicar procesos químicos para visualización como teñirlas de color, esto es posible en MHD [12].

3.2 Microscopía holográfica digital

La microscopía es un área de investigación y aplicación de la holografía digital. El acceso a la intensidad, así como perfiles de fase hacen a la microscopía holografía digital sea potente y versátil. Una serie de técnicas de la holografía digital se desarrollan especialmente para la microscopía de imágenes y es posible debido al potencial de la holografía.

La idea reconstrucción de frente de onda era el planteamiento original de Gabor para mejorar el microscopio óptico en 1947 [1]. Con la invención del láser en 1960 la microscopía holográfica se tornó realidad [5].

La microscopía holografía digital es una técnica de procesado de imágenes digitales que permite la visualización de imágenes en alta definición y con resolución similar al microscopio óptico y de obtener información tanto cualitativa y cuantitativa [18].

Una microscopía con base en la holografía digital se tiene la gran ventaja de que es un método no invasivo y no destructivo, además permite recuperar el frente de onda para el análisis de datos cuantitativos de intensidad y fase.

Con aplicaciones como la caracterización de dispositivos, análisis de formas microscópicas, o la identificación de micro-partículas y a microorganismos convierten a la microscopía holográfica digital en un método realmente potente y atractivo [5,8,19,20].

La óptica necesaria para MHD consiste en una fuente de iluminación láser, un interferómetro con óptica para microscopía, una cámara digital y una computadora con software necesario para programación por ejemplo LabView o Matlab.

3.2.1 Interferómetros para MHD

Los dos tipos más comunes de interferómetros son el de Michelson y el Mach-Zehnder. El interferómetro de Michelson es apropiado para un objeto reflejante, pero tiene la posibilidad de transmisión doble para un espécimen transparente en un espejo. El interferómetro Mach-Zehnder es usado para objetos transparentes, pero necesita más elementos ópticos. En la Figura 3.00 se muestra la configuración de ambos tipos de interferómetros para microscopía holográfica digital.

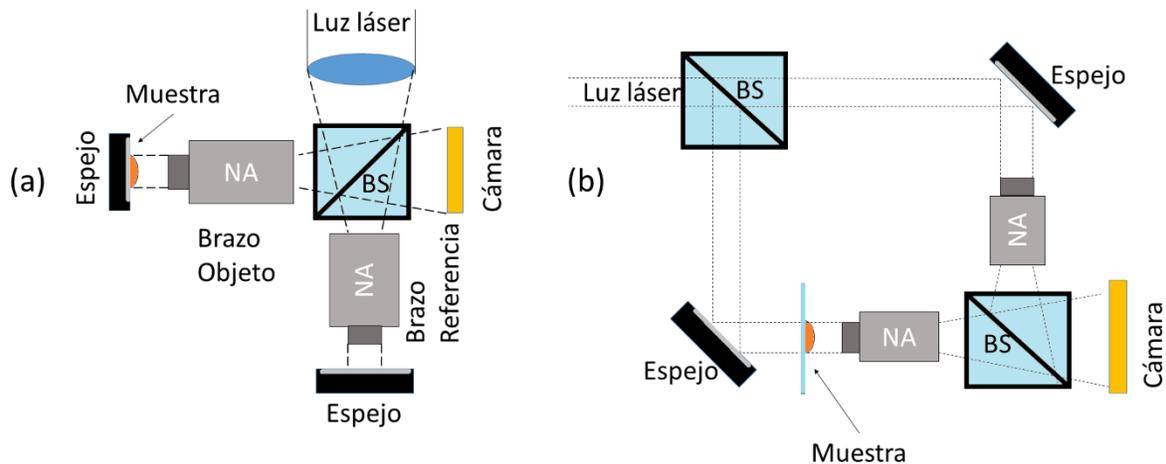


Figura 3.00 (a) Interferómetro Michelson para MHD por reflexión. (b) Interferómetro Mach-Zehnder para MHD por transmisión.

Se pueden tener diferentes variantes para ambos interferómetros con inclusión de divisores de haz u otros componentes ópticos, considerando que causan una aberración mínima. Existen muchas técnicas en holografía digital que corrigen diferentes tipos de aberraciones e imperfecciones del arreglo óptico. Por lo que los interferómetros pueden incluir también aberturas, atenuadores y polarizadores para controlar la intensidad de haz objeto o referencia [8].

3.3 Trabajo de tesis en MHD

En el presente trabajo de tesis se desarrolló un microscopio holográfico digital para microscopía óptica basada en holografía digital. Para el desarrollo del microscopio se realizará para este trabajo únicamente por reflexión.

A continuación, se describirá el desarrollo de la técnica para la reconstrucción numérica de holograma digitales por espectro angular, el método teórico se abarco en el capítulo 2.

El código del programa desarrollado se colocó en el apéndice C y también se describió parte de la programación del instrumento virtual desarrollado en LabView en el capítulo 4, mientras que en el capítulo 5 se muestran las aplicaciones desarrolladas para diversos tipos de muestras.

3.3.1 Montaje experimental

Se implementó el siguiente montaje experimental que se muestra en la Figura 3.01.

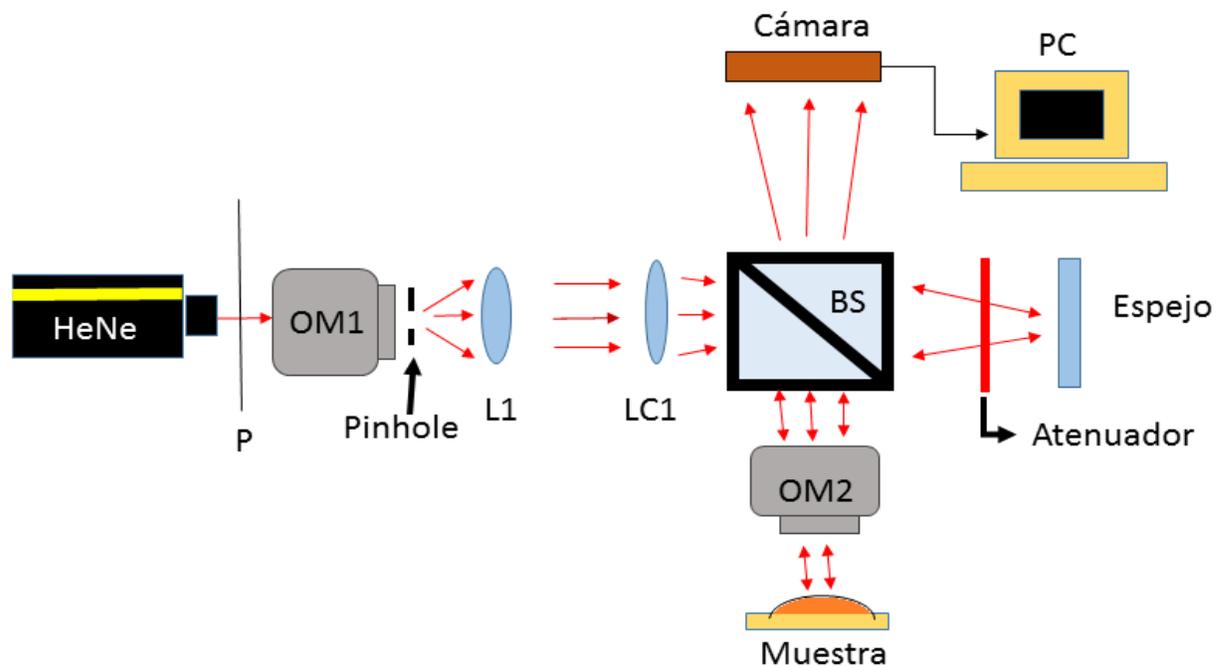


Figura 3.01. Montaje experimental para el registro digital de hologramas digitales.

El montaje de la Figura 3.01 se utilizó un interferómetro Michelson para el grabado de hologramas digitales en donde P es un polarizador para el control de intensidad del láser y OM1 es un objetivo de microscopio 20X para expandir el haz de láser, L1 es una lente 25cm de distancia focal para colimar, LC1 es una lente de distancia focal de 14.5 cm con el propósito de condensar el haz hacia OM2, BS es un divisor de haz (Beam Splitter), OM2 puede

ser un objetivo 10X o 20X. Para tener control en la intensidad del haz de referencia se empleó un atenuador colocado con un ángulo para evitar interferencia parásita, el atenuador puede ser un filtro interferencial o una densidad óptica graduada. Este montaje experimental se montó en el laboratorio de procesamiento con láser del IICO vea la Figura 3.02.

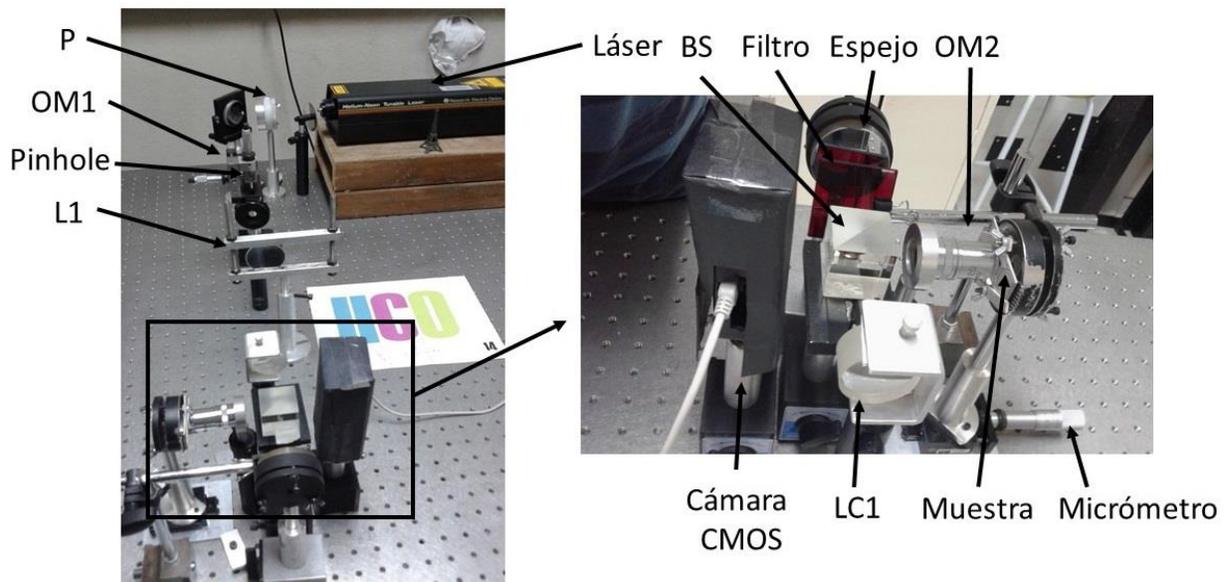


Figura 3.02. Montaje experimental para el grabado de hologramas digitales.

El arreglo óptico está montado sobre una mesa óptica neumática anti vibración con ello se garantiza que los hologramas digitales no presenten ningún tipo de alteración por movimientos o vibraciones externos (considerando la alta sensibilidad de un interferómetro). El laboratorio está habilitado para holografía y holografía digital puesto que es un cuarto oscuro.

El montaje es empleado para el registro de hologramas digitales usando una sola longitud de onda y también se tiene la posibilidad de aplicar la técnica de desenvolvimiento de fase por multi-longitud de onda (por el láser sintonizable).

3.3.2 Cámara CMOS

Para el registro de los hologramas digitales se utilizó una cámara CMOS de marca IDS modelo UI-1482LE vea en la Figura 3.03. Cuenta con una resolución de imagen de 2560X1920 y un ancho de pixel $\Delta x = 2.2\mu\text{m}$. Con este dispositivo se podrá realizar el registro de hologramas digitales con una alta calidad. La cámara no cuenta con óptica propia, se trabajó tal como se muestra en la Figura 3.03. Se anexo en el apéndice B.2 los detalles técnicos de la cámara.

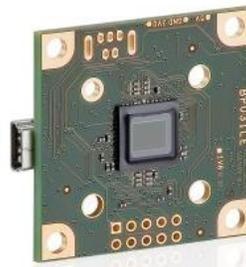


Figura 3.03. Cámara CMOS IDS UI-1482LE.

3.3.3 Láser

Como fuente de luz cuasi coherente se utilizó un láser sintonizable con longitudes de onda de 633, 612, 604, 594, 543nm vea el aparato en la Figura 3.04.



Figura 3.04. Láser sintonizable.

3.3.4 Reconstrucción de hologramas digitales por espectro angular

La reconstrucción de hologramas digitales por el método espectro angular da varias ventajas una de ellas es el fácil computo que conlleva realizar este procesamiento de imágenes a pesar de que se requieren 2-FFT. Otra ventaja es que permite la supresión de término de difracción cero en el espectro de frecuencia de manera eficaz. Además de filtrar el término $O(x,y)R^*(x,y)$ (ver ecuación 3 del capítulo 2) permite la supresión de interferencias no deseables, que se manifiestan en el espectro angular total, provocadas por reflexiones parasitas [15,21,22].

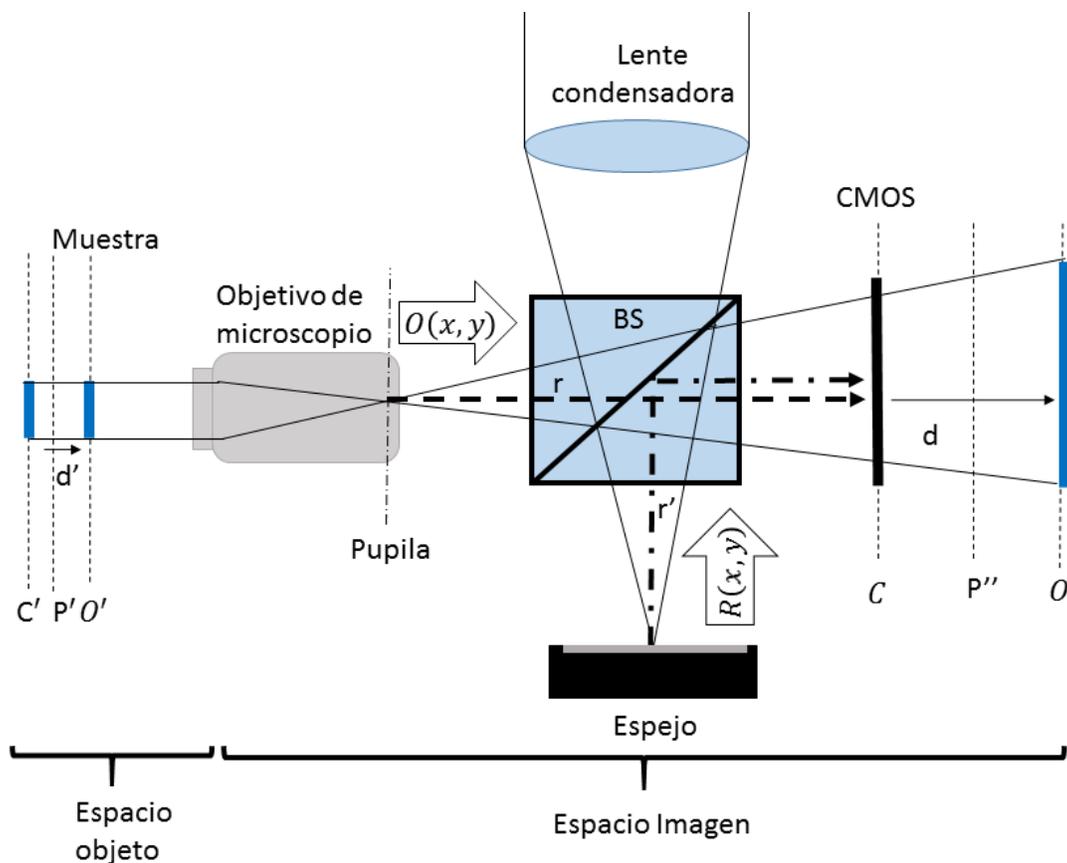


Figura 3.05. Configuración de microscopio holográfico digital en modo reflexión.

En la Figura 3.05 se muestra la configuración del microscopio holográfico digital. En donde O' es el plano objeto y O es plano de reconstrucción de la muestra. Los planos P' y P'' son los planos óptimos tanto en espacio objeto e imagen [9,10]. La cámara CMOS posicionada en el plano C en donde se registra el patrón de interferencia $U_H(x, y)$, debida por la onda de referencia $R(x, y)$, y la onda objeto $O(x, y)$ el patrón es descrito por las ecuaciones 3 y 7 del capítulo 2. $U_H(x, y)$ al digitalizarla es una matriz de tamaño $M \times N$ que contiene la información del holograma digital que se registra en la cámara CMOS.

El método requiere que la onda objeto de referencia y la onda objeto sean ondas planas por lo que es necesario corrección de curvatura en el plano de cámara [23].

Una vez aplicada la corrección de curvatura en el plano de la cámara el campo difractado será equivalente al iluminar a una abertura con un patrón cosenoidal que se describe matemáticamente por la ecuación 7 y el campo difractado será similar a la Figura 2.03.

Las componentes de Fourier $+1$, 0 , -1 de la Figura 2.03 corresponde en holografía a la imagen virtual, orden cero e imagen real distorsionada vea estos términos de difracción en Figura 2.01.

3.3.4.1 Curvatura en el plano de cámara C

En la Figura 3.05 se muestra la trayectoria de rayos en el microscopio holográfico digital en donde la luz proveniente de la lente condensadora es dividida por el divisor de haz (BS).

La luz que pasa por el divisor de haz sin ser desviada es enfocada cerca del espejo para después ser reflejada al divisor y dirigida al plano de la cámara C . Entonces el haz de referencia es una onda esférica divergente con radio r' que en la aproximación de Fresnel corresponde:

$$R(x, y) = e^{\frac{+ik(x^2+y^2)}{2r'}}. \quad (30)$$

Mientras que la luz proveniente de la lente condensadora que es desviada por el divisor de haz es dirigida al objetivo de microscopio para ser colimada e incidir en la muestra, cuando la luz es reflejada por la muestra y retorna al objetivo, la luz se concentra cerca de la pupila del objetivo para luego llegar al plano de la cámara C. El haz objeto es una onda divergente con radio r :

$$O(x, y) = e^{\frac{+ik(x^2+y^2)}{2r}}. \quad (31)$$

El término $O(x, y)R^*(x, y)$ de la ecuación 3 o término +1 en el plano de la cámara está dado por:

$$O(x, y)R^*(x, y) = e^{\frac{+ik(x^2+y^2)}{2r''}}. \quad (32)$$

El término +1 en el plano de la cámara C describe una onda divergente con radio r'' donde:

$$\frac{1}{r''} = \frac{1}{r} - \frac{1}{r'}. \quad (33)$$

3.3.4.2 Corrección de curvatura en el plano de cámara

La reconstrucción numérica de hologramas digitales por espectro angular requiere que la onda de referencia y la onda objeto sean ondas planas por lo que hay que realizar una corrección de curvatura en la onda de referencia y objeto.

El término de interés $O(x, y)R^*(x, y)$ tiene una curvatura en el plano de la cámara descrito en la ecuación 32.

Para corregir la curvatura debido al término $R^*(x, y)$ se multiplica la matriz holograma $U_H(x, y)$ por una máscara de fase $C_R(x, y)$:

$$C_R(x, y) = e^{\frac{+ik(x^2+y^2)}{2r'}}, \quad (34)$$

donde $C_R(x, y)$ es una lente con foco en r' de manera:

$$U_1(x, y) = U_H(x, y)C_R(x, y) = U_H(x, y)e^{\frac{+ik(x^2+y^2)}{2r'}}. \quad (35)$$

Ahora solo se debe corregir la curvatura debido al objetivo de microscopio, se multiplica la matriz $U_1(x, y)$ por una máscara de fase $C_{OM}(x, y)$:

$$U_2(x, y) = U_1(x, y)C_{OM}(x, y) = U_1(x, y)e^{\frac{-ik(x^2+y^2)}{2r}}, \quad (36)$$

donde $C_{OM}(x, y)$ describe una lente con una distancia focal r , desarrollando $U_2(x, y)$:

$$U_2(x, y) = U_H(x, y)C_R(x, y)C_{OM}(x, y) = U_H(x, y)e^{\frac{-ik(x^2+y^2)}{2r''}}, \quad (37)$$

donde el término $e^{\frac{-ik(x^2+y^2)}{2r''}}$ es una lente $C_R(x, y)C_{OM}(x, y)$ con una distancia focal r'' que corrige la onda divergente dada por $O(x, y)R^*(x, y)$ en la ecuación 32.

Reinterpretado la Figura 3.05 como un sistema óptico afocal debido a la lente $C_R(x, y)C_{OM}(x, y)$, donde la luz no converge ni diverge después de pasar por esta lente, vea esta reinterpretación en la Figura 3.06. Un análisis completo de un sistema óptico afocal para MHD se detalla en la referencia [24].

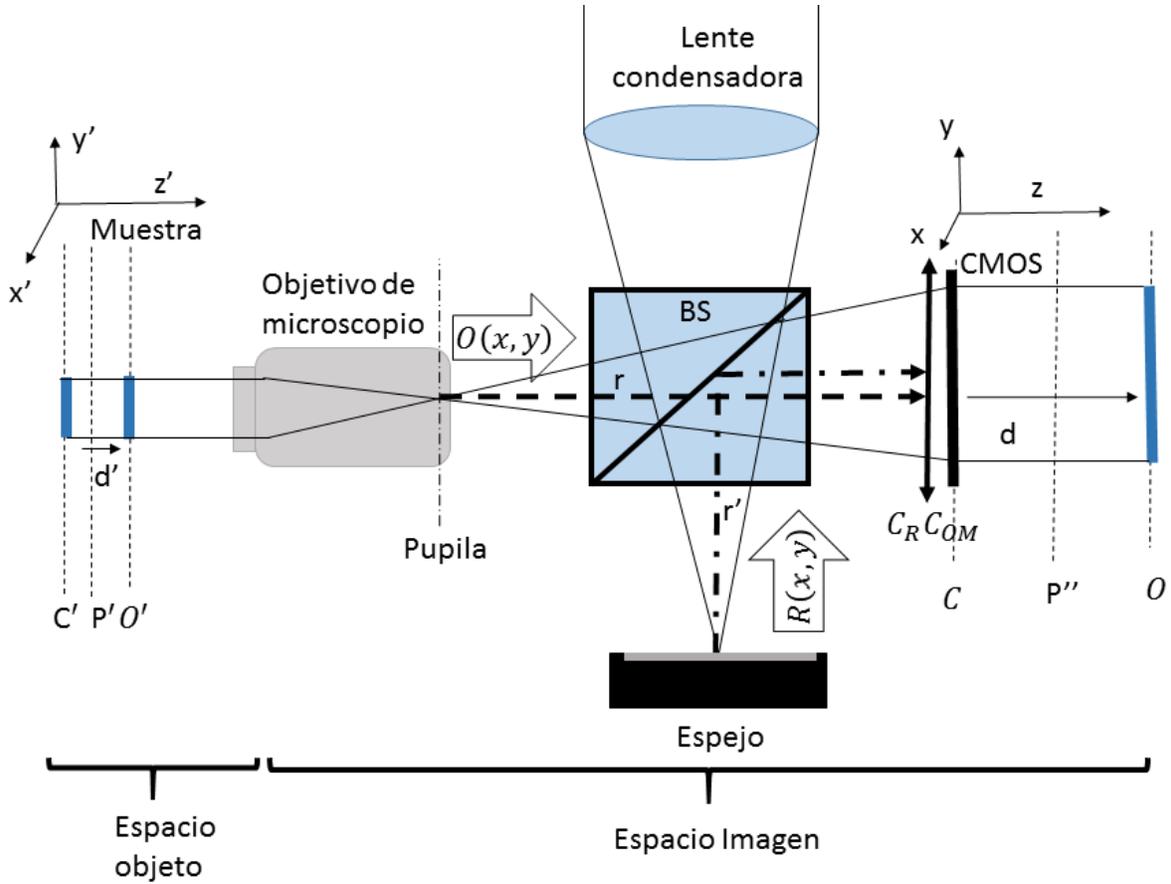


Figura 3.06. Reinterpretación de microscopio holográfico digital como sistema óptico afocal debido a la lente $C_R(x, y)C_{OM}(x, y)$.

3.3.4.3 Espectro angular y filtraje espacial

El espectro angular es la transformada de Fourier del campo de entrada $U_2(x, y, 0)$:

$$A_0(k_x, k_y, 0) = FFT \left\{ U_H(x, y, 0) e^{\frac{-ik((x-s)^2+(y-l)^2)}{2r''}} e^{i(dk_x(x-s)+dk_y(y-l))} \right\}, \quad (38)$$

donde el operador $FFT\{\}$ es la transformada rápida de Fourier o en inglés Fast Fourier Transform. El término $e^{i(dk_x(x-s)+dk_y(y-l))}$ es un prisma para mover el campo de entrada $U_2(x, y, 0)$ con el propósito de centrar el término $+1$ en el centro de las frecuencias espaciales.

En la ecuación 38 las variables espaciales (x, y) cuyo valor discretizado es $x = m\Delta x$, $y = n\Delta y$ donde para la cámara utilizada $\Delta y = \Delta x$, Δx es el ancho del pixel:

$$m = 0, 1, 2 \dots M - 1, \quad (39)$$

$$n = 0, 1, 2 \dots N - 1, \quad (40)$$

en el cual M y N son el total de columnas y filas de la matriz.

Similarmente discretizado la frecuencia espacial k_x con $\Delta k_x = \frac{2\pi}{M\Delta x}$ y semejantemente k_y con Δk_y .

Las constantes $s = \frac{M\Delta x}{2}$ y $l = \frac{N\Delta y}{2}$ son para centrar la lente en la matriz y evitar que solo se muestre un cuarto de la lente y de igualmente el prisma descrito.

En la Figura 3.07(b) se muestra el espectro angular de un holograma, en donde se visualizan los términos +1, 0, -1.

Para filtrar el término +1 primero se debe mover el campo de tal manera que término +1 quede en el centro de las frecuencias espaciales dándole valores a $\frac{dk_x}{\Delta k_x}$ y $\frac{dk_y}{\Delta k_y}$ [pixeles] en el prisma de la ecuación 38. Para filtrar las frecuencias espaciales correspondientes al término +1 se utiliza un filtro pasa bajos circular donde k_r es la frecuencia de corte circular de manera que:

$$A_{01}(k_x, k_y, 0) = \begin{cases} A_0(k_x, k_y, 0) & \text{si } \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < k_r, \\ 0 & \text{si no.} \end{cases} \quad (41)$$

3.3.4.4 Reconstrucción de hologramas en el espacio objeto y espacio imagen

En la Figura 3.06 se muestran los dos espacios objeto e imagen, la relación de ambas es la magnificación lateral G . Donde x, y, k_x, k_y son coordenadas espaciales y frecuencias espaciales del espacio imagen y para el espacio objeto lo son x', y', k'_x, k'_y . La relación entre ambos sistemas coordenados es $x' = \frac{x}{G}$ y $k'_x = Gk_x$ como lo son $\Delta x' = \frac{\Delta x}{G}$, $\Delta k'_x = G\Delta k_x$ de igual manera para y e k_y con y' e k'_y . Se considera que la muestra está solo en aire y no en un medio como agua, aceite, por lo que la propagación solo es en el aire [21,22].

La reconstrucción numérica de hologramas en espacio imagen es:

$$U_{p''}(x, y, z_{p''}) = FFT^{-1} \left\{ A_{01}(k_x, k_y, 0) e^{i \frac{((k_x - s_k)^2 + (k_y - l_k)^2) z_{p''}}{2k}} \right\}, \quad (42)$$

donde el término $e^{i \frac{((k_x - s_k)^2 + (k_y - l_k)^2) z_{p''}}{2k}}$ describe la propagación en el aire del plano cámara C a plano optimo P'' donde $z_{p''}$ es la distancia del plano C a P'' de la Figura 3.06. En el apartado 4.5.3 del capítulo 4 se detalla más acerca de estos planos. Las constantes s_k y l_k son para centrar la función en la matriz de frecuencias espaciales. El término de propagación $e^{i \frac{(k_x^2 + k_y^2) z_{p''}}{2k}}$ es una aproximación paraxial de término exacto $e^{ik_z z_{p''}}$. Ambos términos de propagación son equivalentes [21,22]. El término paraxial a diferencia del término exacto ofrece mayor velocidad de procesamiento de datos. La reconstrucción numérica en el espacio objeto es (vea además el apéndice A.1):

$$U_{p'}(x', y', z'_{p'}) = FFT^{-1} \left\{ A_{01}(k'_x, k'_y, 0) e^{i \frac{((k'_x - s'_k)^2 + (k'_y - l'_k)^2) z'_{p'}}{2k}} \right\}. \quad (43)$$

La relación entre $z'_{p'}$ y $z_{p''}$ es [21,24]:

$$z_{p''} = z'_{p'} G^2; \quad (44)$$

dando como resultado:

$$U_{p''}(x, y, z_{p''}) = U_{p'}(x', y', z'_{p'}), \quad (45)$$

donde $U_{p''}(x, y, z_{p''})$ es el campo difractado en el espacio imagen en el plano optimo P'' y

$U_{p'}(x', y', z'_{p'})$ es el campo en el plano objeto en un plano optimo P'.

3.3.4.5 Reconstrucción de intensidad y fase

La intensidad del campo complejo del frente de onda reconstruido es:

$$I(x', y') = |U_{p'}(x', y', z'_{p'})|^2 \quad (46)$$

y donde la fase es:

$$\varphi(x', y') = \text{Tan}^{-1} \left\{ \frac{\text{Im}[U_{p'}(x', y', z'_{p'})]}{\text{Re}[U_{p'}(x', y', z'_{p'})]} \right\}. \quad (47)$$

$\text{Re}[U_{p'}(x', y', z'_{p'})]$ es la parte real del campo complejo $U_{p'}(x', y', z'_{p'})$ y

$\text{Im}[U_{p'}(x', y', z'_{p'})]$ la parte imaginaria del campo.

Con la reconstrucción de fase se puede encontrar la altura de cualquier de objeto en estudio.

La diferencia de camino óptico (DCO) entre la onda de referencia $R(x, y)$ y la onda objeto

$O(x, y)$ esta dado por:

$$DCO = \frac{\lambda\varphi}{2\pi}, \quad (48)$$

donde λ es la longitud de onda φ es la diferencia de fase entre la onda objeto y la onda de referencia en cada punto (x, y) . Con la configuración óptica del interferómetro de Michelson la luz viaja hacia el objeto para ser reflejada y viajar de regreso de manera que la altura es un medio DCO , entonces la altura h se relaciona con la diferencia total de fase φ [18,25]:

$$h = \frac{1}{2} DCO = \frac{\lambda\varphi}{4\pi}. \quad (49)$$

3.3.4.6 Reconstrucción de un holograma digital con la técnica propuesta

Se utilizó una tarjeta de resolución de la Fuerza Aérea de los Estados Unidos USAF 1951 para esta demostración. El objetivo de microscopio usado es 20X con una iluminación láser con una longitud de onda de 633nm. Se obtuvo la reconstrucción numérica del frente de onda de $U_{p'}(x', y', z'_{p'})$ que corresponde a la reconstrucción numérica en el espacio objeto.

El holograma digital U_H se muestra en la 3.07(a). El espectro angular del holograma digital se muestra en la Figura 3.07(b) donde se visualizan las frecuencias espaciales de los términos de difracción $-1, 0, +1$ donde los términos -1 y $+1$ son las frecuencias de las imágenes gemelas, además de frecuencias parasitas. El término $+1$ es centrado en el centro de las frecuencias espaciales con valores de prisma $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y}$ en unidades en pixeles y es filtrado con un filtro pasa bajos en la Figura 3.07(c). En el apéndice A.2 se detalla cómo se obtienen los valores correctos de $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y}$. La reconstrucción de del frente de onda $U_{p'}$ se obtiene dado una distancia de reconstrucción $z'_{p'}$, donde la imagen es nítida y por lo tanto en un plano optimo P' . En Figura 3.07(d) se muestra la reconstrucción de intensidad donde se visualiza la tarjeta de resolución USAF de manera nítida.

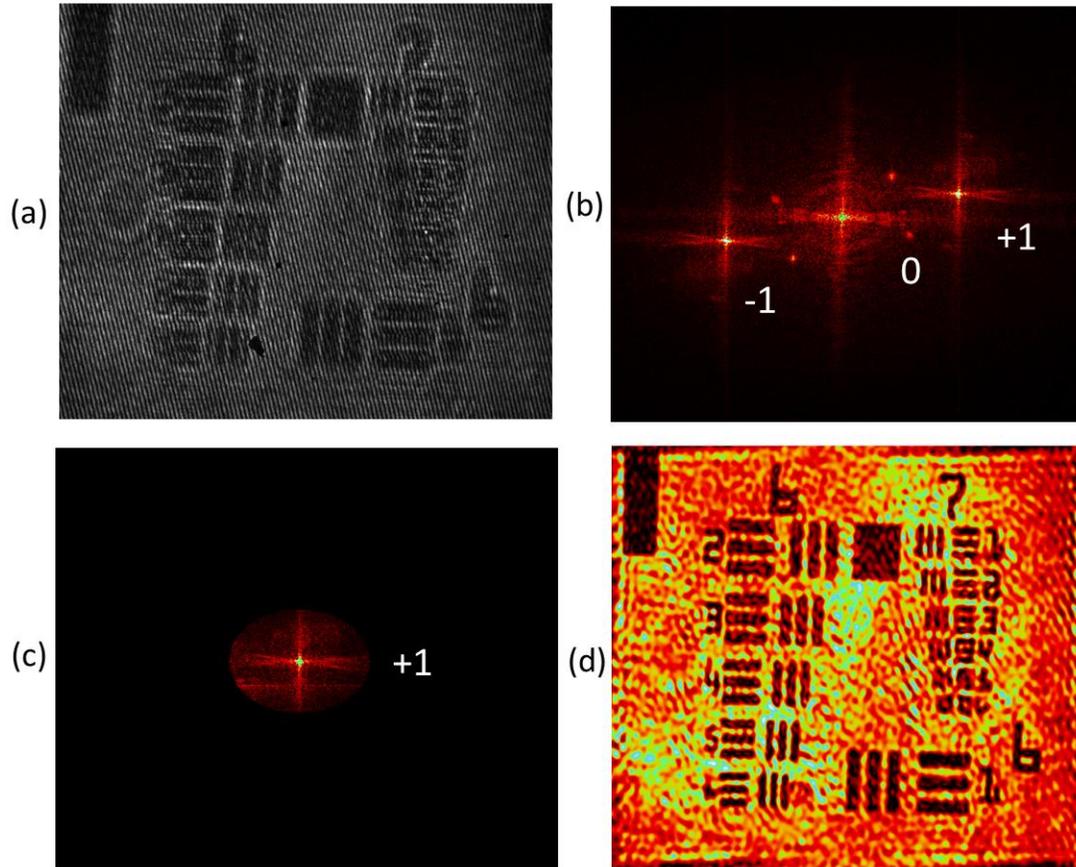


Figura 3.07. Reconstrucción de un holograma digital de una tarjeta de resolución USAF. (a) Holograma digital U_H . (b) Espectro angular A_0 del holograma digital. (c) Término +1 centrado y filtrado. (d) Reconstrucción de intensidad $|U_{p'}|^2$ del frente de onda $U_{p'}$.

3.4 Modulación de Fase

Los mapas de fase generados por holografía digital o por cualquier técnica procesado de imágenes sufren de modulación 2π [5,8]. Un objeto que tenga variaciones de altura que superen a la longitud de onda produce una modulación de fase con discontinuidades 2π .

En la Figura 3.08 se muestra un ejemplo donde se tiene un perfil de una rampa cuya altura máxima A es mucho mayor a la longitud de onda λ . La discontinuidad 2π sucede debido a que el perfil supera a la longitud de onda para en este caso suceden en cinco ocasiones.

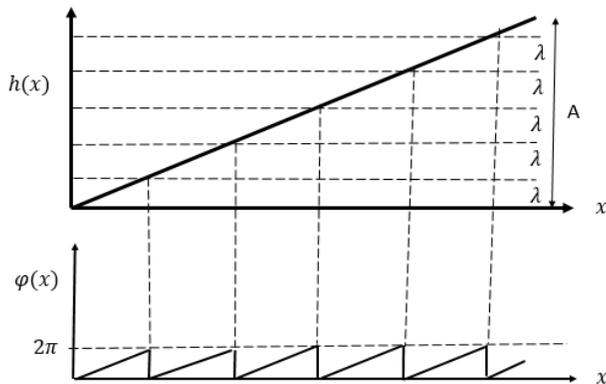


Figura 3.08. Un perfil y su mapa de fase modulada.

En la Figura 3.09(a) se muestra el mapa de fase real de un perfil rampa junto con su mapa de fase con modulación 2π y de igual manera 3.09(b) se muestra el mapa de fase real de un perfil esférico en comparación con su mapa de fase modulada.

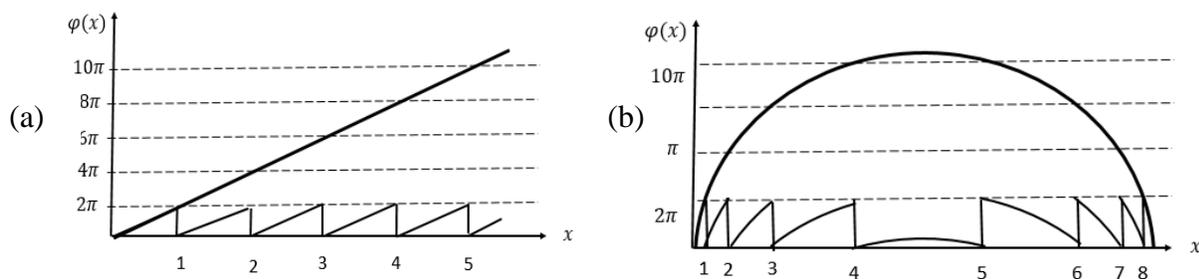


Figura 3.09. (a) Mapa de fase de un perfil de una rampa donde se muestra la fase real y la modulada. (b) Mapa de fase de un perfil esférico donde se muestra la fase real.

3.4.1 Holografía de multi-longitud de onda

En ciertos casos los mapas de fase obtenidos por holografía digital tienen ambigüedades 2π por lo que la fase se encuentra envuelta. Muchos algoritmos computacionales para remover las ambigüedades han sido desarrollados, pero son poco eficientes cuando las topologías de fase son complicadas y además tiene un costo computacional elevado [8]. Un desenvolvimiento de fase basado en el método de multi-longitud de onda ofrece una manera fácil, rápida y muy eficiente para remover las ambigüedades 2π de los mapas de fase.

3.4.2 Desarrollo de fase por dos longitudes de onda

La base del desarrollo de fase por dos longitudes de onda es la longitud de onda sintética [8,23,25,26]. Para dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 la longitud de onda sintética está definida por:

$$\Lambda = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{|\lambda_1 - \lambda_2|}. \quad (50)$$

Dos hologramas de un mismo objeto son adquiridos con dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 , los cuales se reconstruyeron numéricamente obteniendo la fase modulada de ambos φ_{λ_1} y φ_{λ_2} , el mapa de fase desenvuelto $\Delta\varphi$ está dado por:

$$\Delta\varphi = \begin{cases} \varphi_{\lambda_1} - \varphi_{\lambda_2} & \text{si } \varphi_{\lambda_1} \geq \varphi_{\lambda_2}, \\ \varphi_{\lambda_1} - \varphi_{\lambda_2} + 2\pi & \text{si } \varphi_{\lambda_1} < \varphi_{\lambda_2}. \end{cases} \quad (51)$$

El valor máximo para remover discontinuidades está dado por la longitud de onda sintética, por lo que la elección de λ_1 y λ_2 es de cuidado. De manera que la longitud de onda sintética debe ser mayor a la variación de altura del objeto.

3.4.3 Simulación para el desarrollo por dos longitudes de onda

La siguiente simulación fue elaborada en LabView. El perfil simulado es una pendiente cuya altura máxima es $7\mu\text{m}$ como se muestra en la Figura 3.10(a). Los perfiles de fase φ_{λ_1} y φ_{λ_2} con $\lambda_1 = 633\text{nm}$ y $\lambda_2 = 584\text{nm}$ ambas con discontinuidades 2π se muestran en la Figura 3.10(b) y Figura 3.10(c). En la Figura 3.10(d) se muestra $\Delta\varphi = \varphi_{\lambda_1} - \varphi_{\lambda_2}$, la resta de las fases moduladas. En la Figura 3.10(e) se muestra $\Delta\varphi = \varphi_{\lambda_1} - \varphi_{\lambda_2} + 2\pi$ cuando $\Delta\varphi < 0$ obteniendo un mapa de fase desenvuelto. El perfil es obtenido con $\Lambda = 7.2\mu\text{m}$ vea la Figura 3.10(f).

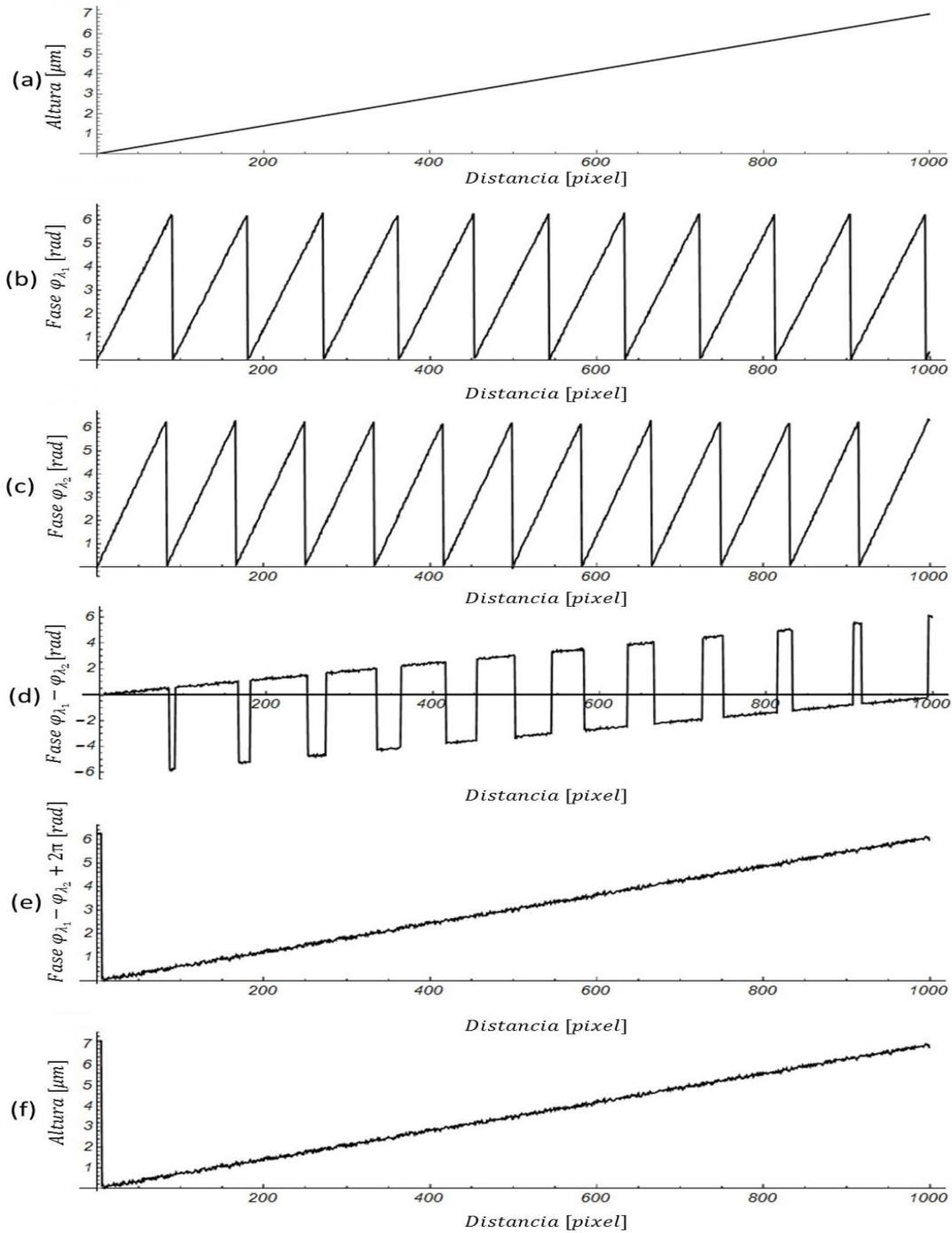


Figura 3.10. Simulación para el desenvolvimiento fase por dos longitudes de onda. (a) Perfil de una pendiente se eleva a un valor de $7\mu\text{m}$. (b) Perfil de fase φ_{λ_1} con $\lambda_1=633\text{nm}$. (c) Perfil de fase φ_{λ_2} con $\lambda_2=584\text{nm}$. (d) Cuando $\Delta\varphi = \varphi_{\lambda_1} - \varphi_{\lambda_2}$. (e) Mapa de fase desenvuelto cuando $\Delta\varphi = \varphi_{\lambda_1} - \varphi_{\lambda_2} + 2\pi$ solo cuando $\Delta\varphi < 0$. (f) Perfil obtenido con $\Lambda = 7.2\mu\text{m}$.

Capítulo 4

Instrumentación Virtual

4.1 Introducción a LabView

LabView es un lenguaje de programación gráfico donde se utilizan iconos en lugar de líneas de texto para crear aplicaciones y a diferencia de otros lenguajes de programación LabView usa la programación de flujo de datos en donde el flujo de datos determina la ejecución del programa.

Los programas en LabView son llamados instrumentos virtuales o VIs, debido a que su operación imita a un instrumento real como multímetros, osciloscopios etc. [27].

Un VI contiene los siguientes componentes:

- Panel Frontal: Interfaz de usuario donde se controla el instrumento virtual y además se despliega la información.
- Diagrama de bloques: Contiene la fuente gráfica de programación del instrumento virtual.
- Conectores: Cables que comunican los bloques, de manera que la información fluya en el instrumento virtual.

4.2 Introducción a NI Vision

Es una biblioteca de VIs para LabView que se pueden utilizar para desarrollar aplicaciones de visión artificial y aplicaciones de imágenes científicas [28]. En holografía digital el proceso la reconstrucción numérica implica procesar un holograma digital que es una imagen digital adquirida por una cámara CCD o CMOS. Por lo cual la holografía digital es una técnica de procesado de imágenes digitales. Un sistema para procesar imágenes, para el caso particular MHD, consiste de seis factores que comprometen la adquisición de un holograma digital:

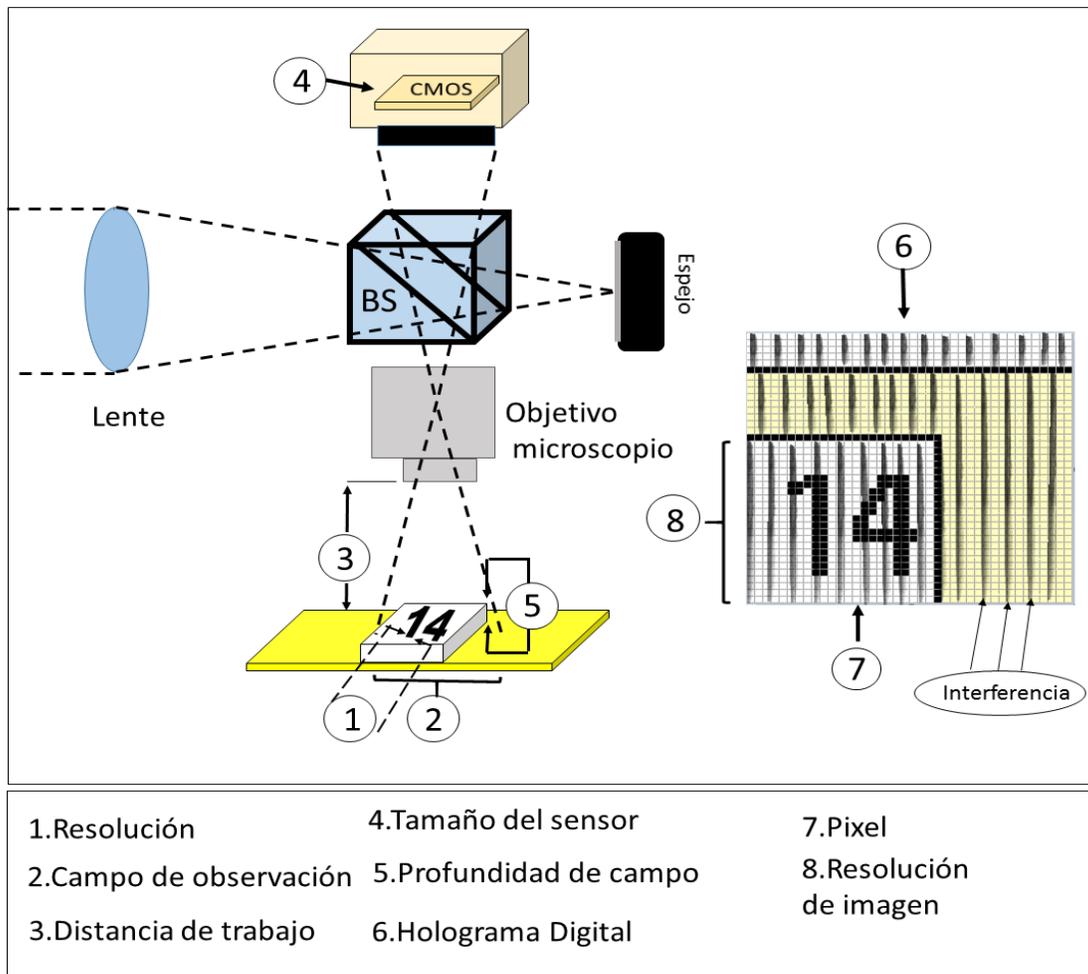


Figura 4.00. Parámetros fundamentales para un sistema de microscopía holográfica digital.

- Resolución: La característica más pequeña que el sistema de imagen puede distinguir.
- Resolución de imagen: La cantidad mínima de píxeles con el cual se puede representar un objeto en estudio.
- Campo de observación: Área total de observación que puede captar la cámara digital donde se puede realizar el estudio.
- Distancia de trabajo: Distancia mínima entre objeto y objetivo de microscopio donde se puede realizar el estudio, este parámetro varía según el objetivo de microscopio.
- Profundidad de campo: Profundidad máxima que permanece en foco del objeto en estudio.
- Tamaño del sensor: Área total en la cual la cámara registra el holograma digital.

En la Figura 4.00 se muestran estos parámetros fundamentales del microscopio holográfico digital [29].

4.2.1 Tipos de Imagen

Las herramientas de NI Vision pueden leer y manipular imágenes raster. Una imagen raster es un arreglo filas y columnas de celdas y a cada celda es llamado pixel, cada pixel contiene la información ya sea de color o intensidad en escala de grises, esto desde la perspectiva espacial de la imagen [30] vea esto en la Figura 4.01.

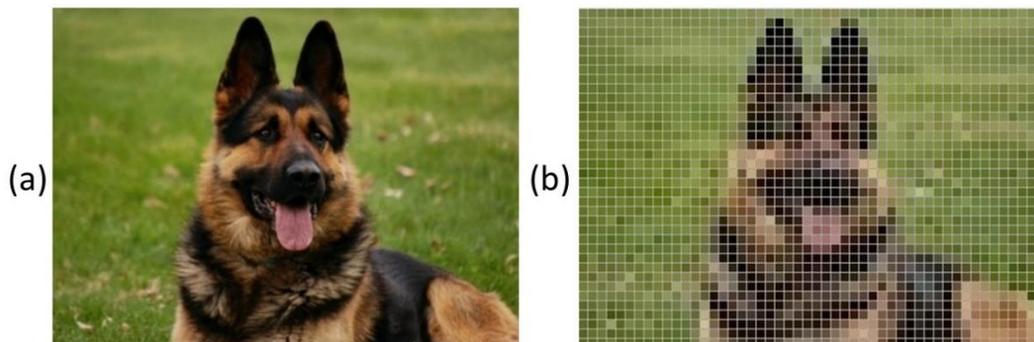


Figura 4.01. (a) Imagen de un pastor alemán. (b) Imagen en raster pixeleada.

Las cámaras adquieren la imagen en formato raster como representación a la luz que detectan. Las cámaras CCD (Charge-Coupled Device) o CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) están compuestas de sensores de luz individuales o pixeles que convierten los fotones incidentes a carga que es proporcional a la intensidad de luz, la información es transmitida a la computadora en formato raster ya sea en USB u otro tipo de comunicación [5].

Las herramientas de NI Vision pueden procesar tres tipos de imágenes [30]:

- Color.
- Escala de grises.
- Complejo.

Cuando se realiza la adquisición de un holograma digital por la cámara CMOS en LabView es adquirida en un formato RGB o color para luego convertirla a una matriz numérica que contiene la información del holograma digital, con ello es procesada en la reconstrucción numérica por espectro angular (revisado en el capítulo 3), con este proceso se obtiene la reconstrucción de intensidad y fase, la información se despliega como dos imágenes en escala de grises usando la funciones NI Vision, por lo cual es de utilidad para el análisis de la información obtenida del objeto en estudio y para el monitoreo en tiempo real.

4.3 Resolución

La resolución es la capacidad de un sistema óptico de aislar dos puntos que se encuentran muy cercanos entre sí de tal modo que se puedan observar separados uno del otro.

Para lograr obtener imágenes finas y ricas de detalles los dos puntos tienen que estar muy próximas uno con el otro [31,32].

4.3.1 Resolución de un objetivo de microscopio

El objetivo de microscopio es el elemento más importante en la formación de imágenes microscópicas debido a que estos establecen la calidad de imagen en cuanto a su poder de resolución. Está formado por un sistema de lentes que corrigen un conjunto de aberraciones que afectan a la calidad de la imagen.

El poder de resolución de un objetivo, tomando en cuenta la difracción, depende de la longitud de onda λ y la apertura numérica del objetivo AN y que definido como[31,32]:

$$Resolución = \frac{0.61\lambda}{AN}, \quad (52)$$

con $\lambda = 543\text{nm}$ la resolución está determinada para los siguientes dos objetivos vea Tabla 4.00.

Tabla 4.00. Poder de resolución de los objetivos utilizados.

Objetivo	AN	Resolución [μm]
10X	0.25	1.32
20X	0.40	0.82

4.3.2 Resolución de imagen

La resolución de imagen se refiere a la cantidad mínima de píxeles necesarios para representar un objeto en estudio [30].

Para obtener una imagen de buena calidad y rica en detalles se requiere una alta resolución de imagen. Entre más resolución tenga la cámara se evitará la pérdida de datos, pero esto a

su vez resulta una desventaja debido a que requiere más poder de procesado y memoria. Por lo que se debe tener la resolución de imagen acorde al PC.

Se puede calcular los pixeles necesarios para representar la característica más pequeña de un objeto, o sea, la resolución del sensor. Como regla, la característica de objeto más pequeña debe ser de al menos 2 pixeles. Para determinar la resolución del sensor se utiliza la siguiente ecuación [29,30]:

$$Resolución\ del\ sensor = \left[2 \frac{Campo\ de\ vision}{Característica\ mas\ pequeña} \right]. \quad (53)$$

En el caso que se requiera obtener una resolución del sensor acorde a la resolución de objetivo de microscopio, la mínima resolución de sensor debe ser calculada tomando en cuenta la magnificación y el campo de observación en 1D y como la característica más pequeña el valor del poder de resolución objetivo, con estos datos se obtiene la resolución mínima que debe tener el sensor vea la Tabla 4.01:

Tabla 4.01. Relación entre la resolución objetivo y resolución de cámara.

Objetivo	Resolución Objetivo [μm]	Magnificación lateral	Campo de observación [μm]	Resolución de imagen mínima [<i>pixeles</i>]
10X	1.35	8	450	666.6
20X	0.82	16	225	548.7

La cámara UI-1482LE con resolución de imagen de 2560X1920 cubre la resolución mínima necesaria. La resolución esta impuesta por el objetivo de microscopio que por la resolución de imagen de la cámara. Esto es la resolución teórica, para encontrar la resolución experimental se utilizó la tarjeta de resolución USAF 1951.

4.3.3 Resolución experimental

En la Figura 4.02(a) se muestra la reconstrucción de intensidad obtenido de un holograma digital de la tarjeta de resolución USAF con un objetivo de microscopio 10X y en la Figura 4.02(b) con un objetivo de microscopio 20X.

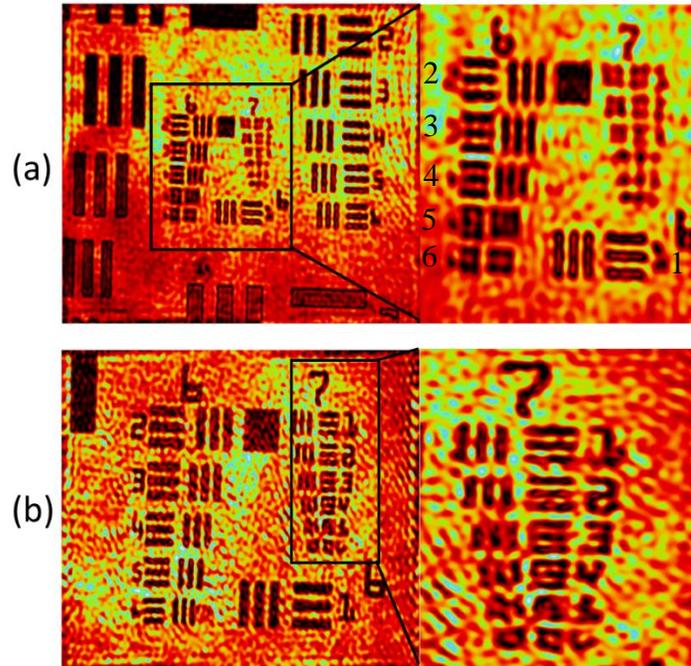


Figura 4.02. Reconstrucción de intensidad de un holograma digital de la tarjeta de resolución USAF. (a) Obtenido con un objetivo microscopio 10X. (b) con un objetivo microscopio 20X.

En la Figura 4.02(a) se muestra la reconstrucción de intensidad de una tarjeta de resolución USAF, donde el microscopio holográfico digital puede resolver el elemento 4 del grupo 6 de la tarjeta de resolución. Mientras que en la Figura 4.02(b) se muestra el microscopio resuelve el elemento 4 del grupo 7 de la tarjeta de resolución. Con estos datos se obtiene la resolución experimental del microscopio holográfico digital, para ambos casos vea esto en Tabla 4.02. Se anexa en el apéndice B.1 los datos técnicos de la tarjeta de resolución USAF.

Tabla 4.02. Resolución teórica y experimental.

Objetivo	Magnificación lateral	Resolución teórica [μm]	Resolución experimental [μm]
10X	8	1.35	5.52
20X	16	0.82	2.76

4.4 Programación en LabView

Debido a que en LabView se programa a bloques, los programas resultan ser demasiado grandes y extensos, por lo tanto, solo se describirá la parte más importante, la reconstrucción de hologramas digitales por espectro angular. Los programas completos se anexaron en el apéndice.

Se realizaron dos programas para la reconstrucción de hologramas digitales, uno para la reconstrucción de una sola exposición y otro para la reconstrucción en tiempo real.

4.4.1 Diagrama de flujo de los programas

El diagrama de flujo del programa que solo realiza la reconstrucción de un solo holograma o una exposición vea Figura 4.03(a). Mientras el diagrama de flujo del programa que reconstruye hologramas digitales en tiempo real se muestra en la Figura 4.03(b).

El proceso reconstrucción numérica por espectro angular, es el proceso más importante y su diagrama de flujo es el que se muestra en la Figura 4.04.

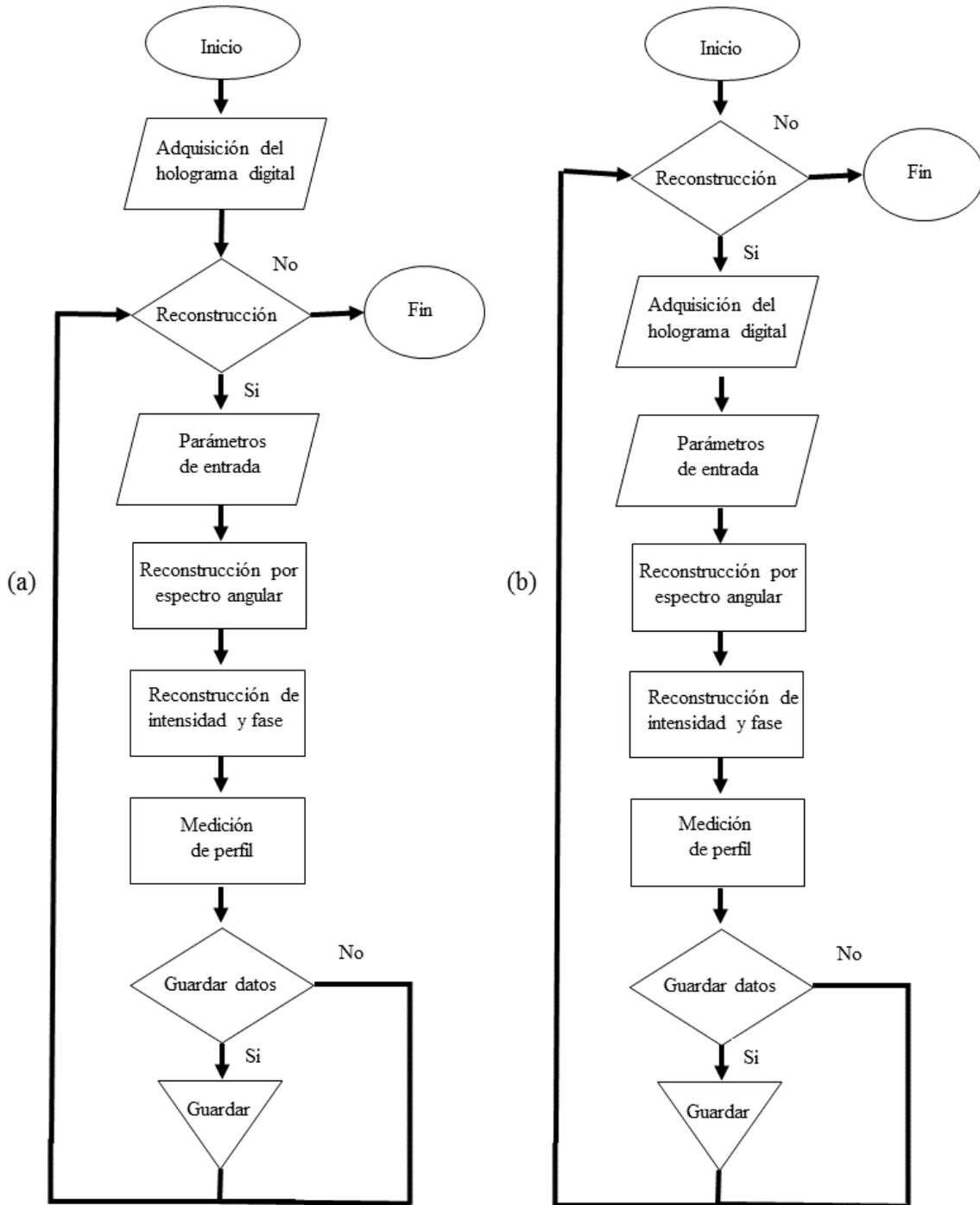


Figura 4.03. (a) Diagrama de flujo del programa que reconstruye hologramas digitales de una sola exposición y en (b) para en tiempo real.

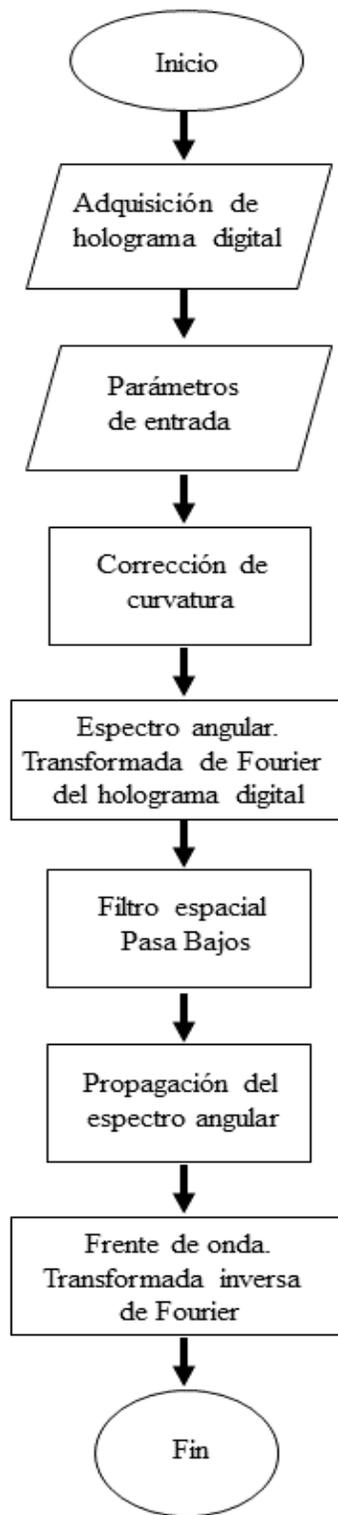


Figura 4.04. Diagrama de flujo del método espectro angular.

4.4.2 Adquisición y procesado de un holograma digital

El primer paso para la reconstrucción numérica de un holograma es la adquisición del holograma. El holograma es registrado por una cámara CMOS y capturado como una imagen digital y es procesada en LabView usando las funciones NI-IMAQdx en la Figura 4.05 se muestra el proceso de adquisición en el diagrama de bloques.

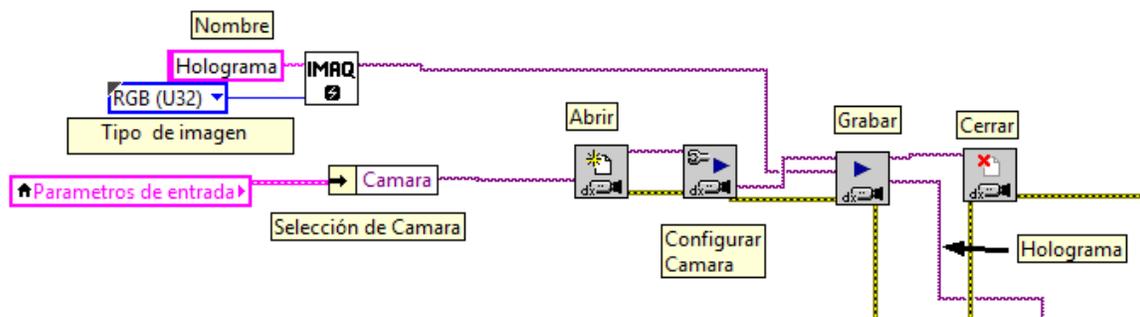


Figura 4.05. Proceso de registro de un holograma en el diagrama de bloques en LabView.

Para procesar el holograma, se realizó dos programas uno que solo registra un holograma o sea de una sola exposición y otro en modo tiempo real.

El programa de una sola exposición el holograma se reconstruye solo en un ciclo while. Mientras en modo tiempo real, el proceso se realiza empleando un patrón de diseño Productor/Consumidor que está basado en el patrón Maestro/Esclavo esto con la finalidad de mejorar la forma en que se comparte información en dos ciclos while corriendo a velocidades distintas.

El patrón de diseño Productor/Consumidor consiste en ciclos while paralelos que se separan en dos categorías; productores y consumidores. La comunicación entre el ciclo productor y el consumidor se realiza utilizando colas de datos.

El uso del patrón Productor/Consumidor tiene el propósito de mejorar los tiempos de procesado en la reconstrucción numérica de un holograma. El ciclo del productor es el proceso de adquisición de un holograma y el consumidor es la reconstrucción numérica por espectro angular.

En la Figura 4.06 se muestra el patrón de diseño Productor/Consumidor aplicado en holografía digital.

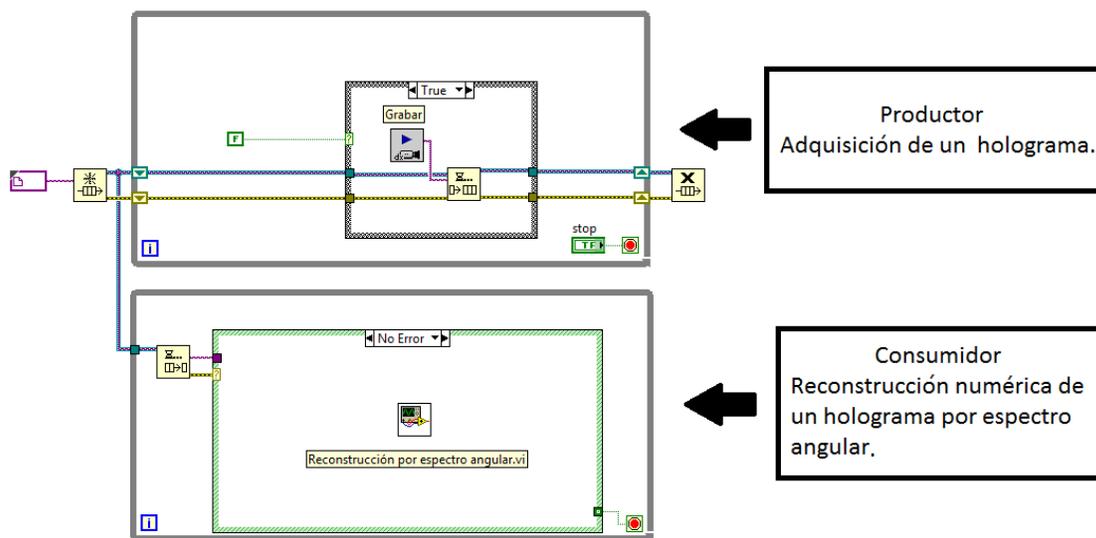


Figura 4.06. Patrón de diseño Productor/Consumidor en el proceso de reconstrucción numérica de un holograma en holografía digital.

La reconstrucción numérica de un holograma se realiza por el método espectro angular, el proceso se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 4.04. Este proceso se realizó dentro de un solo subvi llamado *Reconstrucción por espectro angular.vi* en la Figura 4.07 se muestra el contenido de este subvi.

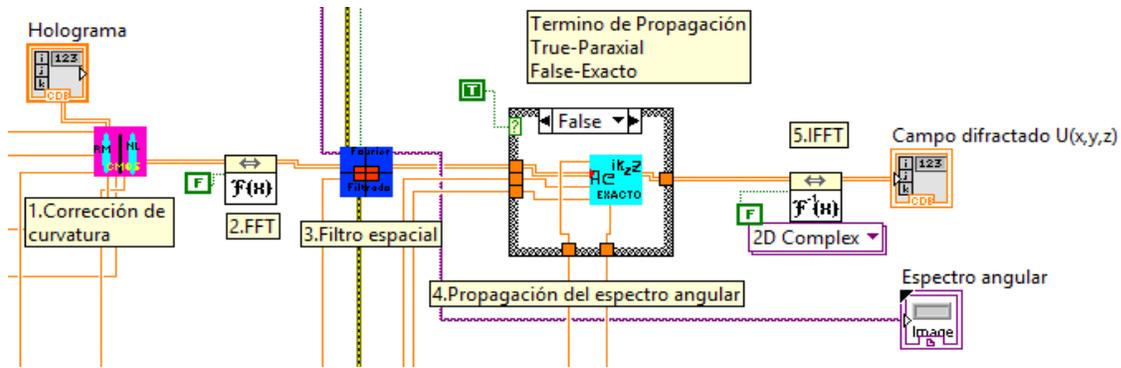


Figura 4.07. El subvi para la reconstrucción por espectro angular.

Este subvi es el más importante del todo el programa debido a que en este se obtiene la reconstrucción numérica del holograma. Este subvi está en el ciclo while del programa de una sola exposición y en el ciclo while del consumidor para en tiempo real.

Para llevar a cabo la reconstrucción numérica se requieren parámetros de entrada para reconstruir un holograma digital. Estos son vea Tabla 4.03.

Tabla 4.03. Parámetros para la reconstrucción del holograma digital

Símbolo	Parámetro
U_H	Holograma digital registrado por la cámara CMOS
λ	Longitud de onda de grabado
Δx	Ancho de pixel
r''	Radio de curvatura
G	Magnificación lateral
$z'_{p'}$	Distancia de reconstrucción
f_c	Frecuencia de corte en %
$\frac{dk'_x}{\Delta k'_x}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y}$	Valores del prisma en pixeles para centrar el término +1

Cuando se adquiere el holograma, la imagen se adquiere como formato RGB antes de realizar la reconstrucción numérica es necesario convertir la imagen en una matriz numérica, donde cada valor de pixel es convertido a un número complejo, de manera que tenemos una matriz cuyos elementos son números complejos, que representa en su conjunto al holograma digital.

El primer paso de la reconstrucción numérica es el subvi del paso 1 de la Figura 4.07 que corrige la curvatura, dentro de este realiza una operación donde multiplica el holograma $U_H(x, y, 0)$ por una lente cuyo foco es el valor de r'' . El segundo paso es la transformada rápida de Fourier (FFT) donde la matriz de valores espaciales en (x, y) son transformados al dominio de las frecuencias espaciales en (k_x, k_y) .

El tercer paso para la reconstrucción numérica del holograma es el filtrado de las frecuencias espaciales del término +1 del espectro angular total. Cuando se realiza la operación FFT la matriz que contiene la información espectral de frecuencias espaciales del holograma son enviados al subvi donde se realiza el filtraje espacial. Vea su contenido en la Figura 4.08.

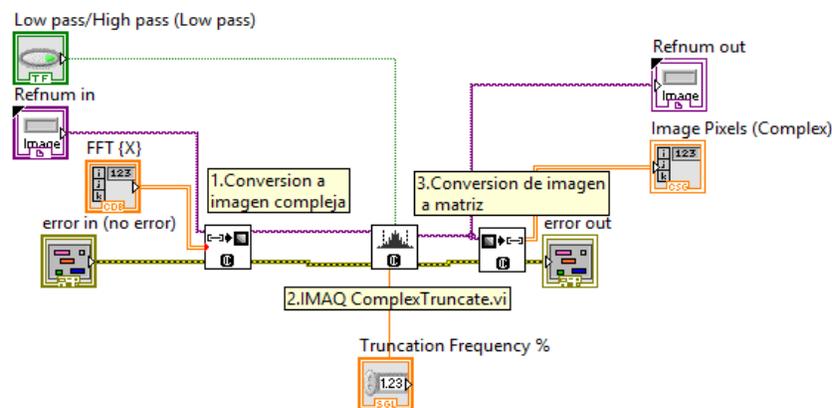


Figura 4.08. Operación de filtraje espacial en el espectro de frecuencias espaciales.

En la Figura 4.08 se muestra el proceso para filtraje espacial que corresponde al subvi del filtro espacial la Figura 4.07. En este proceso la matriz es convertida a una imagen compleja,

luego se emplea la función IMAQ ComplexTruncate.vi para el filtrado. Este subvi permite elegir si se usan un filtro pasa bajo o pasa altos, y realiza el corte dando un número en porcentaje fc que corta a un porcentaje de manera circular con respecto al total de resolución de imagen. Si por ejemplo la resolución de imagen es de 200×200 y la frecuencia de corte es de 10% solo dejara pasar las frecuencias espaciales que estén a un radio circular de 25.23 píxeles en el caso de un filtro pasa bajos. De manera que fc está relacionado con k_r de la ecuación 41. Si la imagen tiene una resolución $N \times N$ el filtro será circular, pero si la matriz es $N \times M$ el filtro será un óvalo.

El cuarto paso de la reconstrucción numérica de un holograma es la propagación del espectro angular, en holografía digital se realiza este paso con el término +1 filtrado. En la Figura 4.07 en la parte de la propagación se empleó una estructura case para selección del tipo de propagación ya sea exacta o de manera aproximada paraxial vea el apartado (3.3.4.4 del capítulo 3). El espectro angular se propaga a una distancia z'_p , que es la distancia de reconstrucción en un plano óptico P' .

Como quinto paso de la reconstrucción se realiza la transformada rápida inversa de Fourier (FFT^{-1}) para obtener el campo difractado o frente de onda reconstruido $U_{p'}(x', y', z'_p)$ a una distancia de reconstrucción z'_p , en un plano óptico P' .

Finalmente las salidas de subvi *Reconstrucción por espectro angular.vi* son la matriz de datos que contiene la información del campo difractado $U_{p'}(x', y', z'_p)$ y una imagen compleja del espectro angular para su visualización en el panel frontal del LabView.

Una vez obtenido el frente de onda complejo numérico se obtiene la reconstrucción de intensidad y fase del frente de onda $U_{p'}(x', y', z'_{p'})$, este proceso se muestra en el diagrama de bloques en LabView vea Figura 4.09.

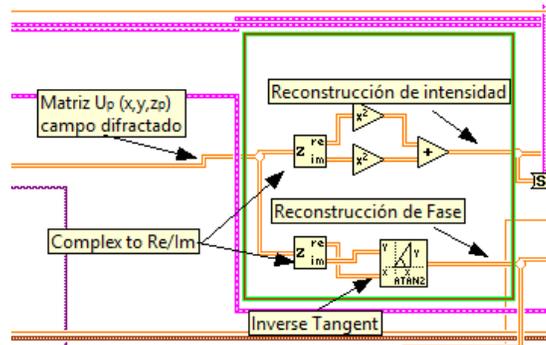


Figura 4.09. Reconstrucción de intensidad y fase.

Para obtener los datos de intensidad se usa la función *Complex to Re/Im* en la matriz del frente de onda numérico $U_{p'}(x', y', z'_{p'})$, cuyos elementos son números complejos esto con la finalidad de separar en dos matrices una con la parte real y la otra la parte imaginaria, el siguiente paso es elevar cada una de la matrices al cuadrado después sumarlas y obtener los datos de intensidad.

Para la fase se usa la función *Complex to Re/Im* para separar parte real e imaginaria y obtener los datos de fase usando la función *Inverse tangent*.

Con los datos de fase se puede obtener la información de profundidad y obtener medición de perfil, además de obtener visualización 3D de la topografía de la muestra.

4.5 Ajuste de parámetros

Para obtener una correcta reconstrucción numérica de un holograma se requiere ajustar ciertos parámetros, estos son vea esto en la Tabla 4.04.

Tabla 4.04 Parámetros de ajuste para calibración.

Símbolo	Parámetro
G	Magnificación lateral.
r''	Radio de curvatura.
$z'_{p'}$	Distancia de reconstrucción en el plano optimo P'.

4.5.1 Magnificación lateral

Para poder obtener el valor correcto de la magnificación lateral del objetivo de microscopio y tener el valor correcto de G, se realiza una calibración del microscopio holográfico digital.

En holografía digital usualmente la calibración se realiza utilizando una tarjeta de resolución USAF 1951. Además, se usaron dos muestras, una era una antena dipolo vea en la Figura 4.10 el ancho del material de oro es de $200\mu\text{m}$ y la otra muestra es una estructura GaP vea la Figura 4.11, cuales se tenían ya caracterizados en otros trabajos [33,34].

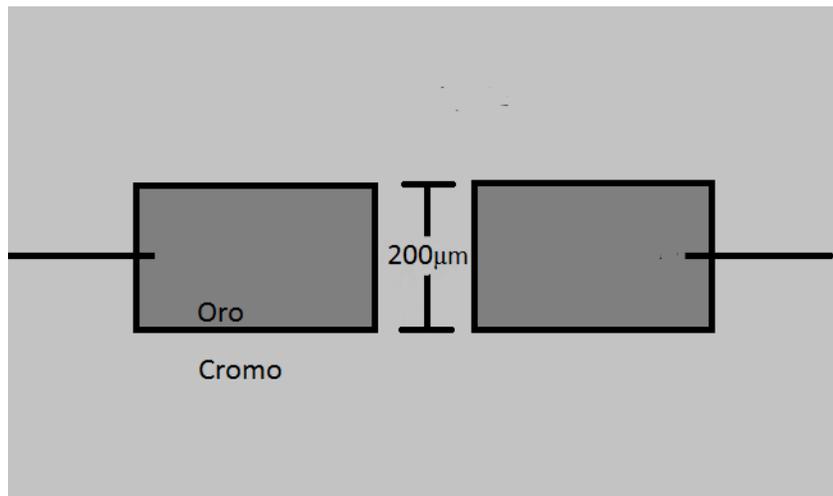


Figura 4.10. Antena dipolo.



Figura 4.11. Estructuras GaP con diferentes zonas.

Con las dimensiones de las muestras de la Figura 4.10 y 4.11 se puede obtener el valor correcto de la magnificación lateral G y poder calibrar el microscopio holográfico digital.

4.5.2 Corrección de curvatura

En el capítulo 3 se demostró que la curvatura en el plano de cámara es provocada por una onda divergente con radio r'' la cual es corregida por una lente positiva con foco r'' . Cuando no se realiza una correcta corrección de curvatura, el mapa de fase presenta aberración esférica.

Dependiendo del sistema de lentes del objetivo de microscopio y del sistema de lentes empleados en el arreglo experimental se pueden tener diferentes curvaturas y, por ende valores distintos de r'' . Una cosa muy común es la modulación 2π que se provoca por una curvatura muy pronunciada se muestra este ejemplo en la Figura 3.09(b).

Para poder corregir la curvatura se realiza un ajuste en el valor de r'' dependiendo de este valor, las mediciones de perfil de fase y de altura son afectados en la Figura 4.12 se muestra el proceso en el cual se corrige este problema ajustando el valor de r'' .

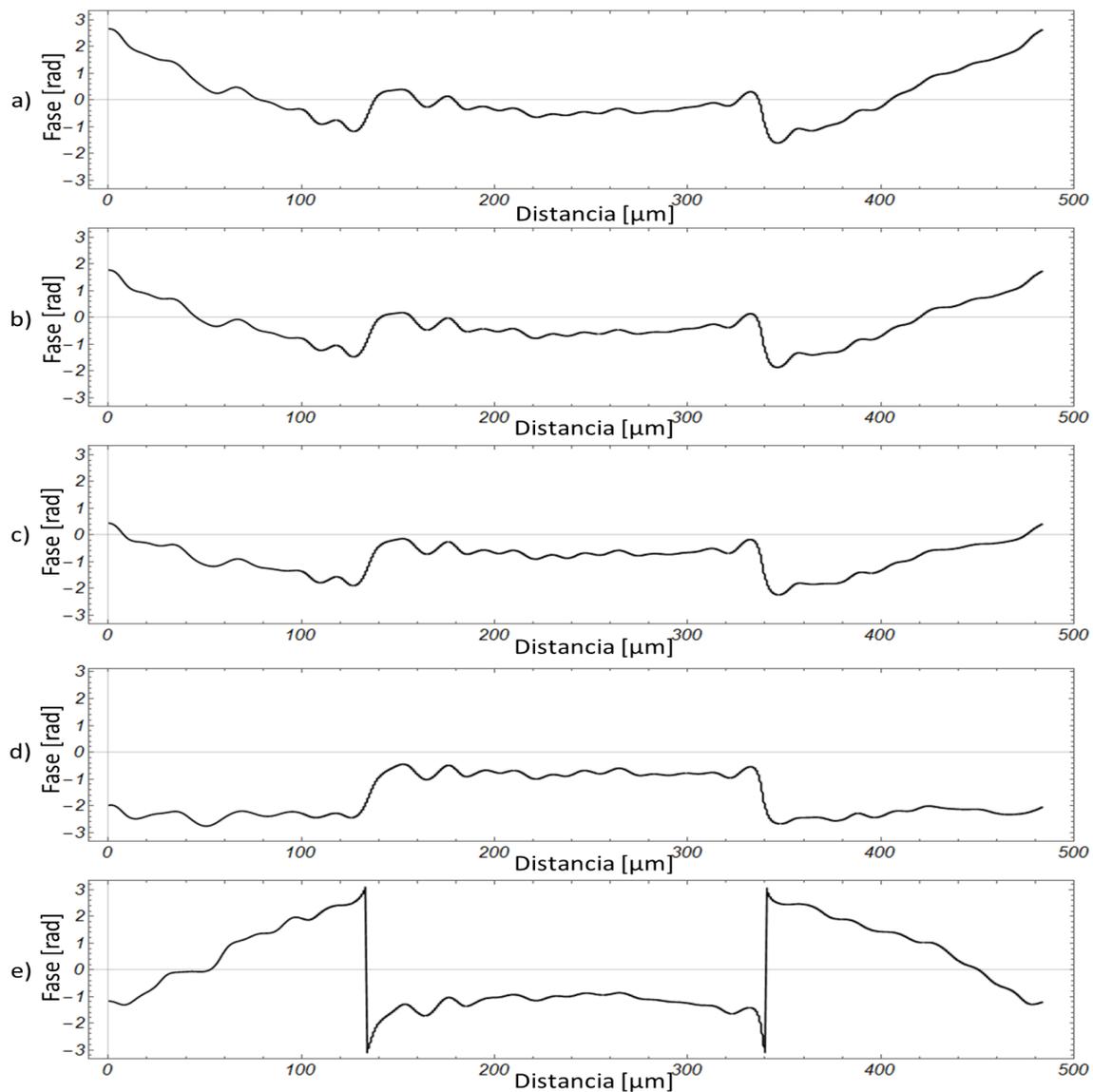


Figura 4.12. Diferentes perfiles de fase de una muestra con distintos valores de r'' . (a) La medición de perfil es alterada por la curvatura, el valor de $r'' = 3m$. (b) La curvatura es levemente corregida cuando $r'' = 30cm$. (c) Perfil cuando $r'' = 15cm$. La lente numérica comienza a corregir la medición. (d) La curvatura es corregida, el mapa de fase no contiene aberración esférica cuando $r'' = 7cm$. (e) Cuando $r'' = 3cm$, la medición con discontinuidad 2π , se presenta debido a la curvatura provocada por la misma lente de corrección.

4.5.3 Propagación de un plano C' a un plano optimo P'

Una característica de la holografía es la información tridimensional del objeto que se obtiene por difracción. Por lo cual en holografía digital partiendo de un holograma registrado por una cámara es procesado para suprimir el término cero de difracción y el término -1 gemelo, además de poder reconstruir la imagen a diferentes distancias simplemente cambiando el valor de la distancia de reconstrucción esto de manera mecánica por una perilla para enfocar en un microscopio u otro tipo de instrumento como por ejemplo un micrómetro. En algunas aplicaciones como microscopía y análisis de partículas es útil poder determinar mejor el enfoque de imagen. Se puede aplicar una técnica de nitidez u otra técnica de auto-enfoque que son exclusivas en holografía digital [8]. En la Figura 4.13, se muestra una parte la configuración del microscopio holográfico y sus respectivos planos, también se muestra en las Figuras 3.05 y Figura 3.06.

En la Figura 4.13 se presenta los espacios objeto e imagen en donde C', P', O' pertenecen al espacio objeto y C, P'', O al espacio imagen. Los planos P' y P'' son los planos donde la imagen es nítida y está perfectamente en foco. O' y O es el plano objeto, O' es el plano donde está posicionado el objeto y O es plano donde es reconstruido el objeto a una distancia de reconstrucción. Finalmente, plano C donde está posicionado la cámara cual registra el holograma.

En la reconstrucción numérica de un holograma es necesario ajustar el parámetro de la distancia de reconstrucción. En el dado caso que la imagen este focalizada en el plano de cámara entonces $C' = P' = O'$ y $C = P'' = O$ por lo cual la distancia de reconstrucción es

cero. Por lo tanto, no es necesario multiplicar el espectro angular por el factor de propagación.

Notar ecuación 27 y 42.

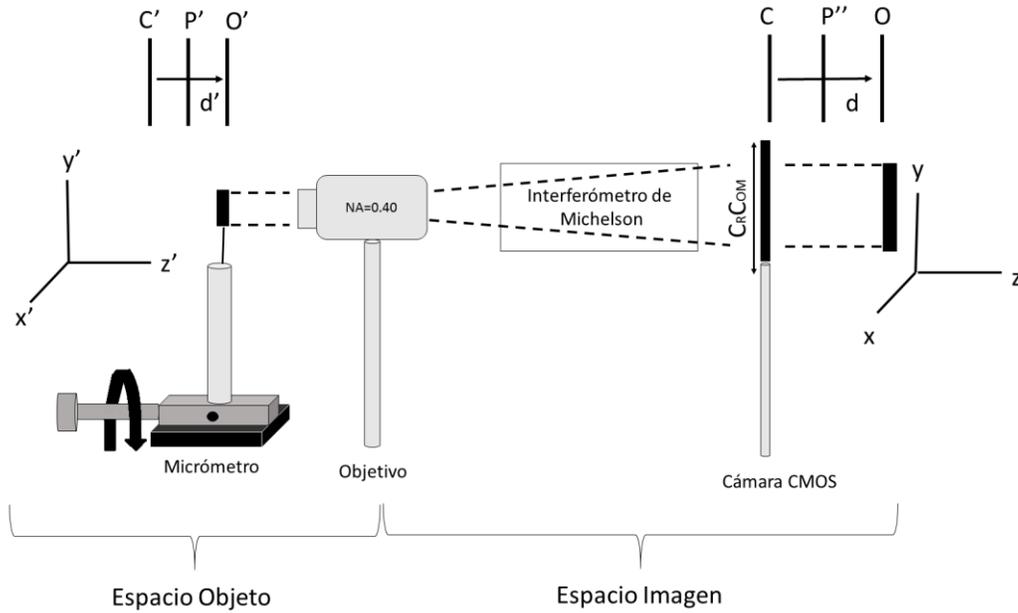


Figura 4.13. Respectiveos planos para la reconstrucción de un holograma.

En la Figura 4.13 se muestra que el objeto situado en el plano O' puede ser movido por la acción mecánica de un micrómetro en las dirección positiva y negativa en z' . El micrómetro tiene una resolución axial $10\mu\text{m}$ y una vuelta completa de giro, éste se desplaza $500\mu\text{m}$ en dirección z' .

Si el objeto en el plano O' es desplazado en la dirección $+z$ por el micrómetro la imagen queda fuera de foco del plano C correspondiente al plano cámara. Entonces el holograma registrado es de una onda objeto $O(x, y)$ desplazada.

Si el micrómetro desplazo el objeto a una distancia d' en la dirección $+z'$, el plano O' se desplazará del plano C' una distancia d' . Lo cual obtendremos una imagen reconstruida en un plano O a partir de un holograma registrado en el plano C a una distancia d .

La relación entre el espacio objeto y el espacio imagen en la reconstrucción numérica de un holograma por espectro angular está dado por la ecuación 45 en el capítulo 3. Con la relación anterior se puede reconstruir un holograma en el espacio objeto en un plano optimo P' donde se obtiene una imagen nítida.

Para obtener el campo difractado $U_{p'}(x', y', z'_{p'})$ a una distancia $z'_{p'}$ en un plano optimo P' se ajustar el parámetro $z'_{p'}$, para hacerlo adecuadamente y evitar un numero de reconstrucción a la azar, se realiza un barrido desde la dirección mínima negativa de z' a una dirección máxima positiva desde el plano C' en el espacio imagen. Para realizar el barrido se usa la siguiente ecuación:

$$z'_n = n\Delta z' - \frac{N}{2}\Delta z'; \quad n = 0 \dots N, \quad (54)$$

donde z'_n es la distancia de reconstrucción en el espacio objeto, $\Delta z'$ es una constante en micrómetros, n es el número de paso, N es el total de pasos.

Para encontrar el valor adecuado de $z'_{p'}$, se selecciona un valor dado por z'_n donde la imagen en la reconstrucción de intensidad es nítida y por ende en un plano optimo P'.

Como ejemplo, se usa la tarjeta de resolución USAF en donde se reconstruye en diferentes planos, esto es posible usando diferentes distancias de reconstrucción z'_n . En este caso $N = 60$ y $\Delta z' = 17\mu m$.

En la Figura 4.14 se muestra diferentes cantidades de n , para el caso $n = 30$ la distancia de reconstrucción $z'_{30} = 0$ vea la Figura 4.14(a), que corresponde a una reconstrucción de intensidad del frente de onda en el plano de cámara. Para valores $n > 40$ la imagen comienza a en focalizarse se observa esto en las Figura 4.14(a) a la Figura 4.14(d), en el caso particular

$n = 54$ la imagen es nítida por lo está es lo más próximo a un plano óptimo, la distancia de reconstrucción en el plano optimo es $z'_{54} = z'_{p'} = 408\mu m$ vea la imagen nitidad en la Figura 4.14(e). Para los casos en donde $n > 54$ la imagen se distorsiona y sale de foco vea la Figura 4.14(f).

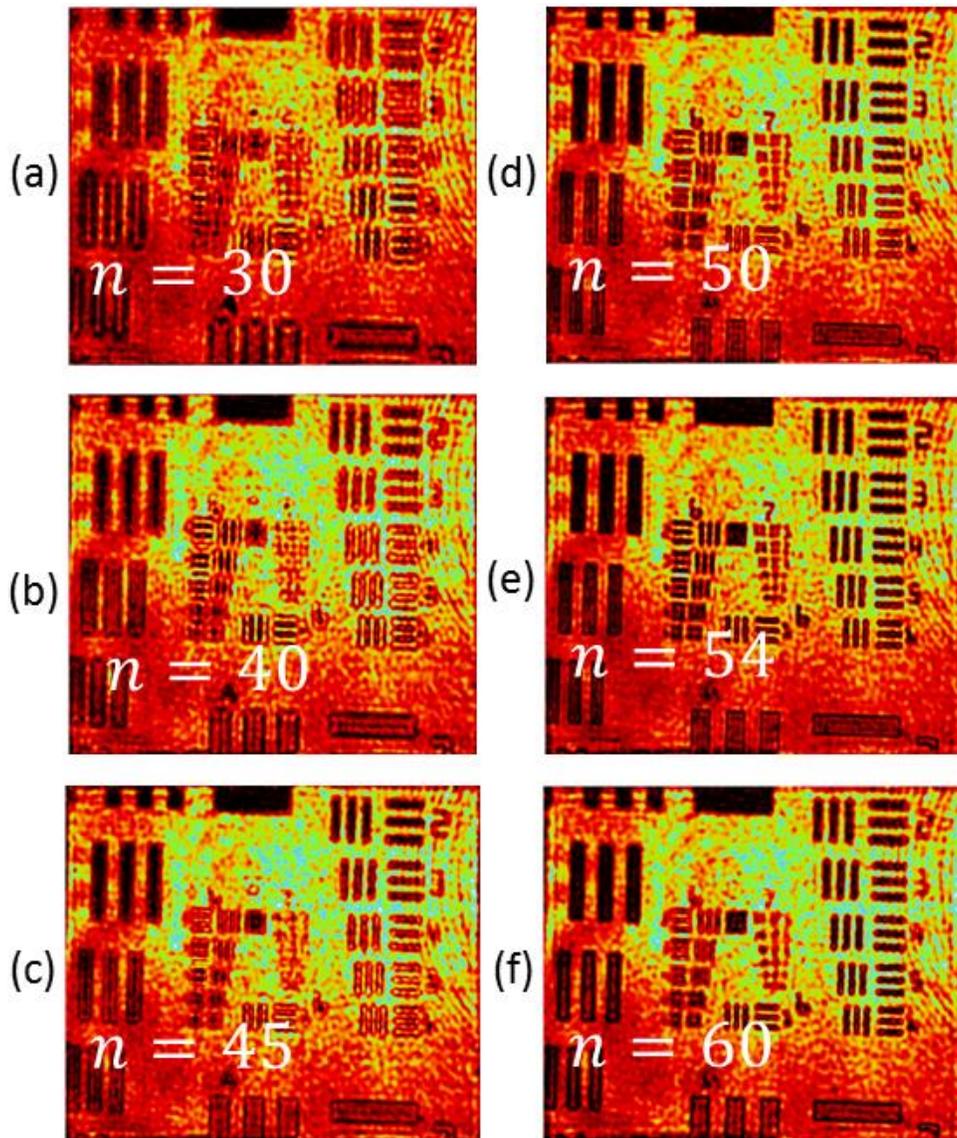


Figura 4.14. Diferentes planos de reconstrucción de intensidad $|U_{p'}|^2$ de la tarjeta de resolución USAF, donde se barre la distancia de reconstrucción para encontrar un plano óptimo.

Capítulo 5

Desarrollo de aplicaciones y resultados

5.1 Aplicaciones en HD y en MHD

La holografía digital y la microscopía holográfica digital dan libertad de poder realizar todo tipo de aplicaciones en áreas como materiales en caso de los semiconductores o en biología (microorganismos), biomédica, medicina (detección de enfermedades) y además otras áreas de estudio [8,20,35,36], propiciando así una gran cantidad de investigaciones alrededor del mundo, esto debido a la flexibilidad del montaje experimental, y obtener información de rápida y la posibilidad de desarrollar aplicaciones para monitoreo en tiempo real.

En este capítulo se revisarán algunos experimentos realizados, para el presente trabajo de tesis, el método de reconstrucción de los hologramas digitales se abarca en el capítulo 3, en el capítulo 4 se revisó el instrumento virtual desarrollado en LabView, todo forman parte del funcionamiento fundamental del microscopio holográfico digital.

En la siguiente Tabla 5.0 se muestran los experimentos realizados y sus respectivas áreas de aplicación.

Además, otros experimentos fueron realizados, pero no se colocaron debido que los resultados no fueron los esperados, porque no se pudo registrar el holograma digital adecuadamente, el arreglo experimental no era el idóneo o la limitación de resolución, vea la Tabla 5.1.

Tabla 5.0 Experimentos realizados en el trabajo de tesis.

Muestra en estudio	Área de aplicación
USAF	Microscopía óptica
Antena Dipolo	Comunicaciones
Estructuras GaP	Semiconductores
Níquel/Silicio	Semiconductores
Epidermis de la cebolla	Biología, botánica
Célula epitelial de la Mucosa	Biología, medicina

Tabla 5.1 Experimentos realizados, pero sin resultados concluyentes.

Muestra en estudio
Conducto Micro fluido
Disco Vinilo o LP
Pistas en circuitos integrados
Contorno de monedas
Esferas metálicas (balín esférico)

Además, en este apartado se discutirán los resultados obtenidos y las ventajas que ofrece la MHD en las áreas específicas de cada experimento realizó en este trabajo.

5.2 Tarjeta de resolución USAF

5.2.1 Tarjeta de calibración para microscopía óptica

La tarjeta de resolución de la Fuerza Aérea de los Estados Unidos USAF 1951 es usada comúnmente para encontrar el límite de resolución de los dispositivos ópticos. Estas tarjetas se caracterizan por poseer un patrón de tres líneas horizontales y verticales, el par de líneas horizontales y verticales son llamados elementos y esos son agrupados en grupos. Los grupos son enumerados como también los elementos dentro de estos. Esto ayuda a saber, hasta qué punto un sistema óptico puede resolver estos patrones de líneas y en base al número de grupo y el número de elemento que se resuelve, se puede calcular el límite resolución [37]. En la Figura 5.00 se muestra una tarjeta de resolución USAF 1951.

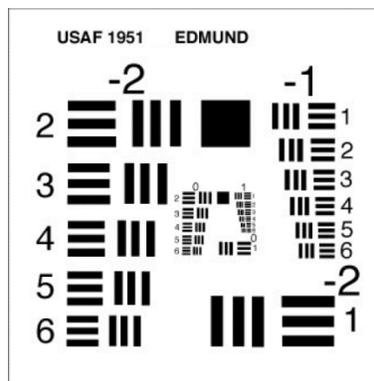


Figura 5.00. Tarjeta de resolución USAF.

5.2.2 Proceso de reconstrucción del holograma digital

La tarjeta de resolución Edmund RES-1 USAF 1951 es utilizada. La tarjeta está cubierta por una capa de cromo y las líneas son transparentes. La longitud de onda utilizado fue $\lambda = 633nm$. El objetivo de microscopio utilizado para el experimento fue 10X, con una magnificación lateral de $G = 7.84$.

En la Figura 5.01 se muestra el proceso de reconstrucción del holograma digital de la tarjeta de resolución USAF. En donde la Figura 5.01(a) se muestra el holograma digital, y en la Figura 5.01(b) se muestra un zoom de esta. El valor para la corrección de curvatura fue $r'' = 36 \text{ cm}$.

El espectro de frecuencias espaciales se muestra en la Figura 5.01(c), los valores para centrar la región de frecuencias espaciales +1 fueron $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = 156 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = -99.6 \text{ pixles}$. La región de interés seleccionada, se filtra con un pasa bajos con una frecuencia de corte $fc = 5\%$ vea esto en la Figura 5.01(d). De esta manera se elimina de manera eficiente del espectro angular los términos 0, -1 y las frecuencias parasitas.

La distancia de reconstrucción fue $z'_{54} = z'_{p'} = 408\mu\text{m}$ con parámetros $N = 60$, $\Delta z' = 17\mu\text{m}$ con valor de $n = 54$ se obtiene el frente de onda, con lo cual se obtiene la reconstrucción de intensidad y fase vea la respectivamente la Figura 5.01(e) y Figura 5.01(f). En el panel frontal en LabView se muestra la imagen en una escala de grises, con una paleta de colore gradiente [27] para observar mejor la distribución de intensidad. De igual manera se utiliza aquí esta paleta de color para mostrar, de una mejor manera, la reconstrucción de intensidad.

En la Figura 5.01(f) se muestra la reconstrucción de fase donde se muestra una línea ROI (Region of Interes) para obtener un perfil de un área de interés.

5.2.3 Resultados

En la Figura 5.02 se muestra la gráfica del perfil de la tarjeta de resolución USAF donde el ROI cruza tres líneas verticales y a lo largo de una horizontal.

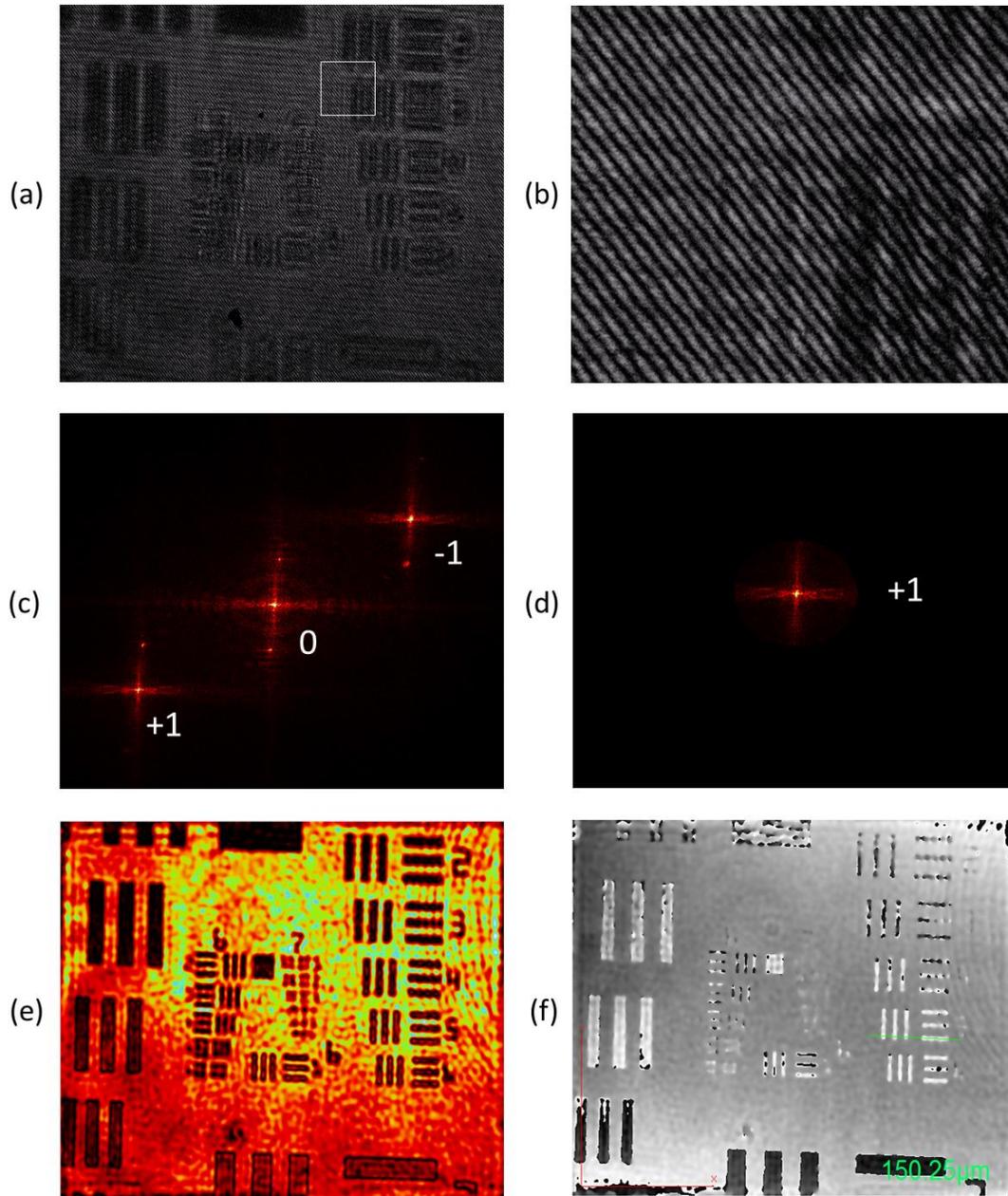


Figura 5.01 Proceso de reconstrucción de un holograma digital. (a) Holograma digital de la antena dipolo. (b) Zoom del recuadro blanco de (a) donde se observan franjas interferencia. (c) Espectro angular del holograma donde se observan los términos $+1$, -1 y el orden cero de difracción. (d) Término $+1$ filtrado en el filtro pasa bajos. (e) Reconstrucción de intensidad. (f) Reconstrucción de fase.

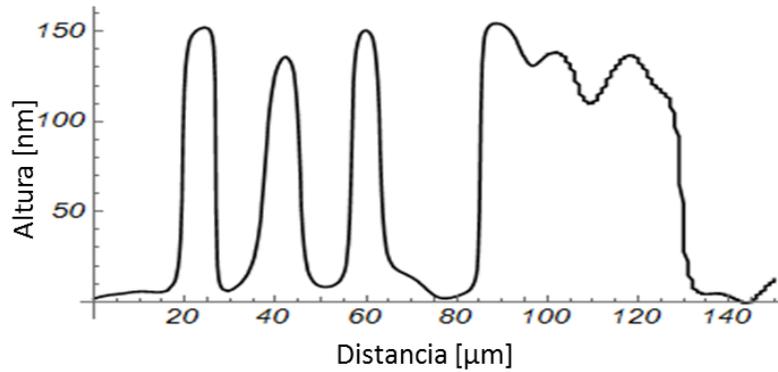


Figura 5.02. Perfil de la tarjeta de resolución USAF.

5.2.4 Análisis de resultados y conclusiones

En la gráfica de la Figura 5.02 se muestra la altura de las tres líneas verticales y una horizontal en donde estas alcanzan una altura superior a 100nm, para este caso no fue posible obtener un perfil con un perfilómetro de la tarjeta de resolución USAF debido a las características físicas de la tarjeta. Se han reportado resultados para el caso de estas líneas de la tarjeta una altura aproximada de 100nm [15,23]. El uso de una tarjeta de resolución USAF en trabajos en holografía digital se centra con el propósito de obtener el límite de resolución y poder calibrar el microscopio holográfico digital. En el siguiente apartado se muestra un dispositivo en el cual se cuantificó el perfil por el método propuesto y se comparó con el perfil de un perfilómetro.

5.3 Antena Dipolo

5.3.1 Qué es y cuál es su aplicación?

El dipolo es una antena con alimentación central, tiene el propósito de transmitir o captar ondas electromagnéticas, son muy fáciles de fabricar y realizar un análisis de estos. Consiste de dos elementos conductores rectilíneos de igual longitud, alineados en el centro y de radio mucho menor que el largo en Figura 5.03 se muestra esta configuración.

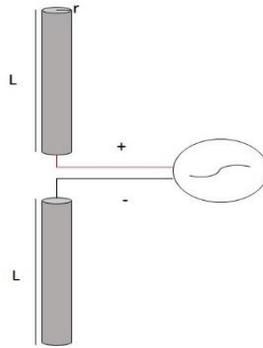


Figura 5.03. Antena dipolo.

El dispositivo nanométrico a caracterizar por MHD es una antena dipolo, donde los contactos de longitud L y ancho M son de oro evaporado sobre una capa de adhesión de cromo vea la Figura 5.04. La fabricación del dispositivo se describe a detalle en la referencia [33].

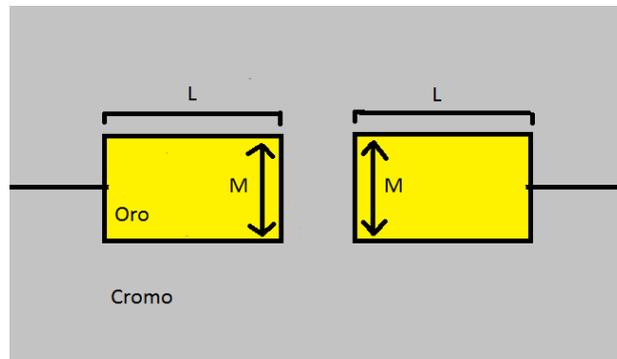


Figura 5.04. Antena dipolar. Donde el ancho $M=200\mu\text{m}$.

Cuando a este tipo de antena se le acopla un microbolómetro se vuelve un detector del infrarrojo y en regiones visibles del espectro electromagnético. Teniendo así diversas aplicaciones en sistemas de comunicación óptica o en óptica aplicada.

Tanto el cromo y el oro cual está fabricado la antena dipolo son metales reflejantes por lo que lo hace ideal para obtener una caracterización por MHD por reflexión. Con esta técnica se puede cuantificar la topografía del dispositivo, mediante la fase del frente de onda reconstruido en MHD.

5.3.2 Proceso de reconstrucción del holograma digital

El dispositivo se colocó frente del objetivo de microscopio en el brazo de objeto del interferómetro de Michelson. La longitud de onda utilizado fue $\lambda = 543nm$. El objetivo de microscopio utilizado para el experimento fue 10X, teniendo así una magnificación lateral de $G = 8.84$.

El primer paso es observar el dispositivo enfocado en la cámara para después ajustar las franjas de interferencia. Esto se realiza ajustando el espejo del brazo de referencia, esto es alejándolo o acercándolo al BS para modificar el radio de curvatura r' y sea lo más cercano al radio de curvatura r del objetivo. Cuando los radios de curvatura r' y r son próximos se observan franjas de interferencia en forma de líneas paralelas y no un patrón de interferencia en anillos.

Se desplaza el micrometro en dirección $+z$ alrededor de un giro y medio o $750\mu m$, de manera que la imagen queda desenfocada del plano C de la cámara. Una vez obtenido correctamente el holograma digital se observa como en la Figura 5.05(a).

En la Figura 5.05 se muestra el proceso de reconstrucción del holograma digital por espectro angular. En la Figura 5.05(a) se muestra el holograma digital registrado en la cámara CMOS para ser procesado en el programa desarrollado en LabView, en la Figura 5.05(b) se muestra el zoom de una parte del holograma se observa las franjas de interferencia, además que los bordes de los contactos no están en foco por ende se observa la difracción.

En la Figura 5.05(c) se muestra el espectro angular donde la región +1 y -1 representa las frecuencias espaciales de las imágenes gemelas, estas se muestran separadas de las frecuencias centrales que son las frecuencias de la región cero de difracción.

En la Figura 5.05(d) la región +1 es centrado en el centro de las frecuencias espaciales dando valores $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = -61$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = 49.6$ en píxeles, para desplazar el campo con el prisma descrito por la ecuación 38. La región de interés seleccionada se filtra con un pasa bajos con una frecuencia de corte $f_c = 3.9\%$. De esta manera se elimina de manera eficiente del espectro angular los términos 0, -1 y las frecuencias parasitas.

Los parámetros para reconstruir el frente de onda en el plano óptico P' utilizando la ecuación 54 (capítulo 4) fueron $N = 60$, tamaño del salto $\Delta z' = 36\mu m$ donde la imagen se reconstruye cuando $n = 51$ por lo que la distancia de reconstrucción en el plano óptico fue $z'_{51} = z'_{p'} = 746\mu m$. En la Figura 5.05(e) se muestra la reconstrucción de intensidad del frente de onda, el dispositivo se observa claramente, los bordes de los contactos de oro están definidos a comparación del holograma digital vea la Figura 5.05(a).

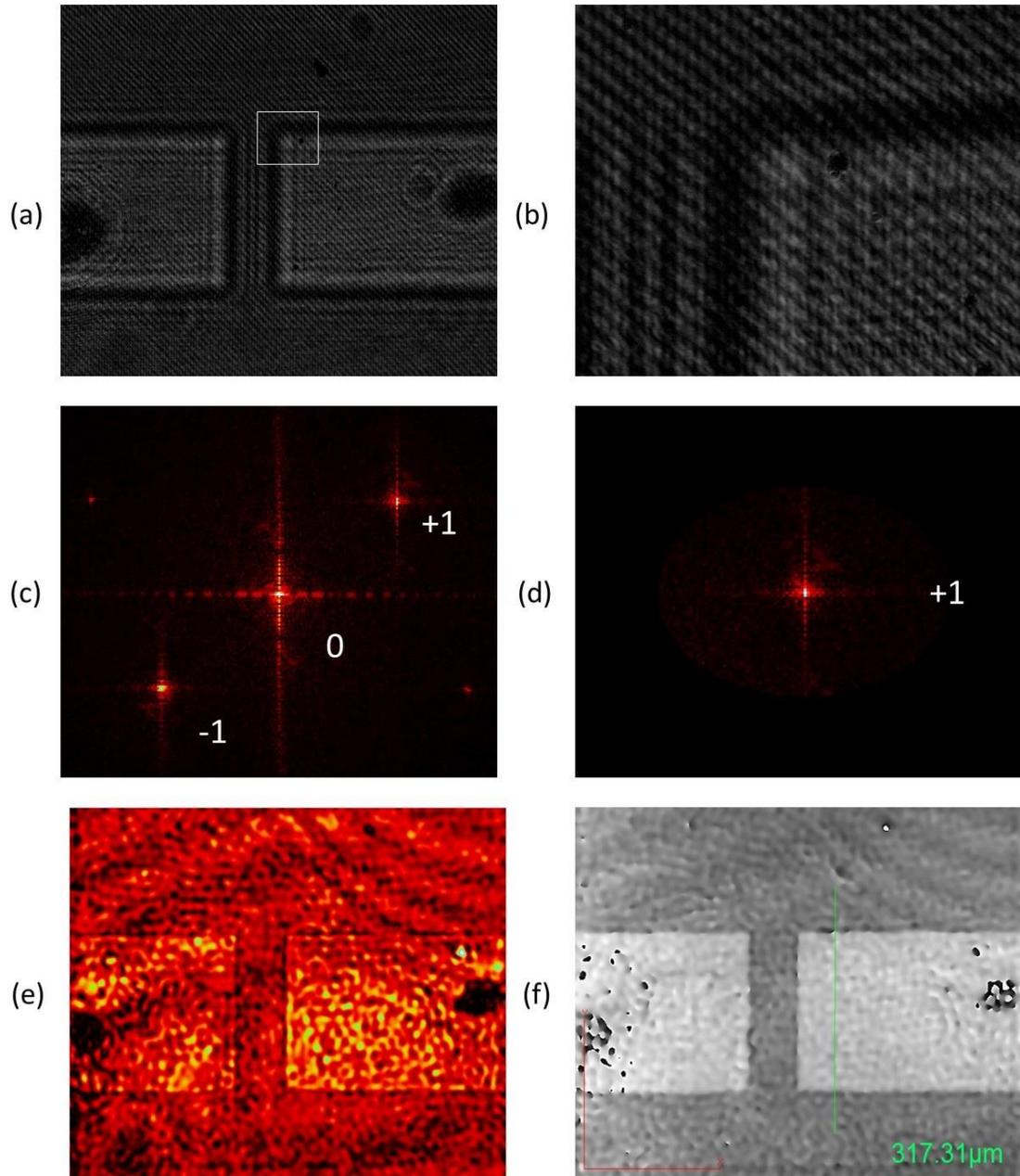


Figura 5.05 Proceso de reconstrucción de un holograma digital. (a) Holograma digital de la antena dipolo. (b) Zoom del recuadro blanco de (a) donde se observan franjas interferencia. (c) Espectro angular del holograma donde se observan los términos +1, -1 y el orden cero de difracción. (d) Término +1 filtrado en el filtro pasa bajos. (e) Reconstrucción de intensidad. (f) Reconstrucción de fase.

En la Figura 5.05(f) se muestra la reconstrucción de fase donde se muestra una línea ROI (Region of Interest) para cuantificar por la fase la topografía correspondiente. Este método permite explorar la topografía de toda la imagen.

5.3.3 Resultados

En la Figura 5.06(a) se muestra el perfil del dispositivo obtenido por MHD, mientras la Figura 5.06(b) se muestra el perfil obtenido por un perfilómetro Alpha-step 500 Surface profiler (vea datos técnicos en el apéndice B.3).

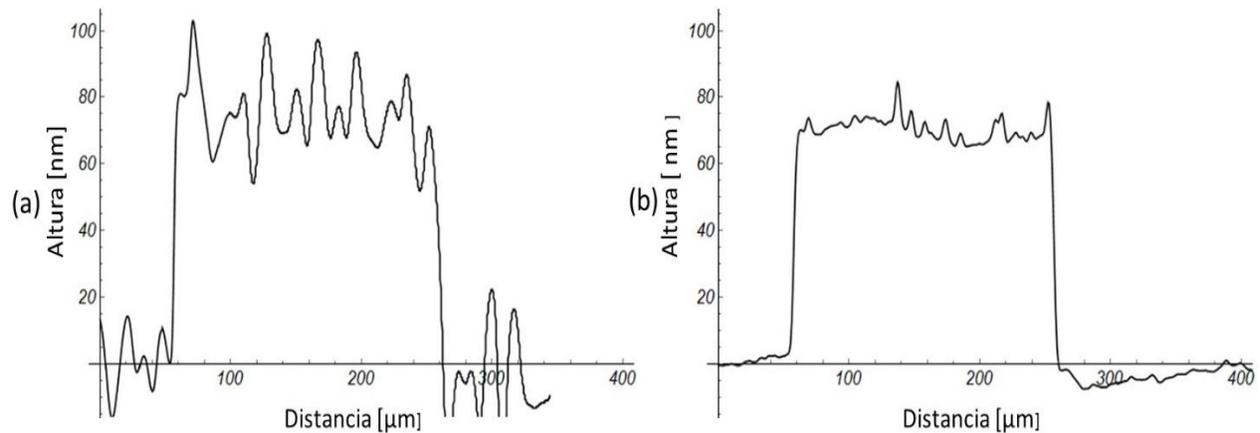


Figura 5.06. Mediciones de perfil con aproximadamente el mismo trayecto a lo largo del dispositivo, pero con diferentes métodos de medición. (a) Medición de perfil con MHD sin contacto físico. (b) Medición de perfil con un perfilómetro.

En la Figura 5.07 se muestra las dos mediciones de perfil juntas además se muestran dos líneas que representan la media aritmética de la oscilación de altura para ambos tipos de mediciones. Se calculó el valor promedio en ambos casos a partir del punto $60\mu\text{m}$ hasta $252\mu\text{m}$.

Donde el valor medio de altura se representa por una la línea azul de la Figura 5.07 tiene un valor de $h_1=75.82\text{nm}$ obtenida por el método de microscopía holográfica digital, mientras la línea negra es la altura media obtenida por el perfilómetro tiene un valor de $h_2 = 70.41\text{nm}$.

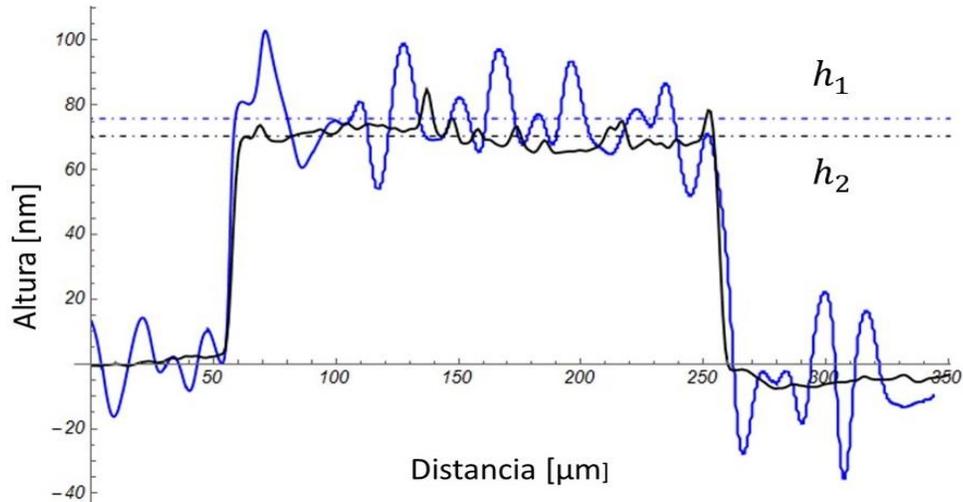


Figura 5.07. Ambas mediciones de perfil. Donde las líneas discontinuas marcan la media aritmética de las alturas de las mediciones.

En la Tabla 5.2 se muestra la relación de error de medición. Además, se incluye los datos de la desviación estándar de ambas técnicas de medición.

Tabla 5.2 Relación entre las alturas obtenidas por los dos métodos.

Método	MHD [nm]	Perfilómetro [nm]	Error absoluto [nm]	Error relativo [%]
Valor	75.8 ± 10.8	70.41 ± 3	4.4	6.26

En la Figura 5.08 se muestra la representación 3D del dispositivo en estudio.

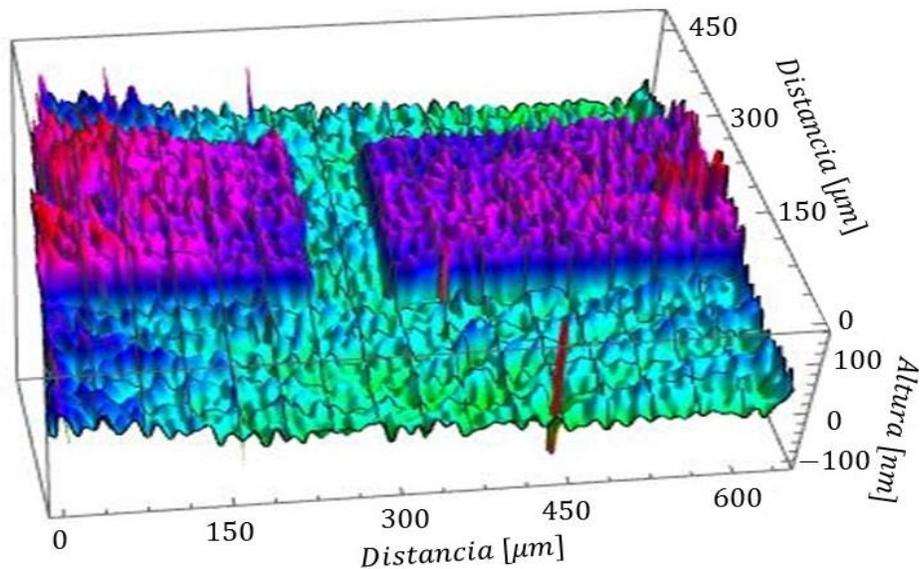


Figura 5.08. Topografía 3D por MHD de la antena dipolo.

5.3.4 Análisis de resultados y conclusiones

El error relativo 6.26% resulta positivo para medición de perfil de no contacto. En la Figura 5.07 se muestra la comparación de ambas mediciones en donde la medición obtenida por MHD proviene de los datos obtenidos de la región de interés de la Figura 5.05(f). En esa trayectoria aproximada fue donde la punta del perfilómetro tomo la medición de perfil.

En la Figura 5.07 se muestra la comparación de ambas mediciones de perfil. Comparando las oscilaciones con los picos de la medición de perfil del perfilómetro se observa que en algunos casos concuerdan por lo que habría posibilidad de poder visualizar deformidades reales pequeñas con variaciones de 2nm a 5nm con el método sin contacto, aunque se observa que los picos son de un tamaño mayor o con amplificación con respecto a los picos del método con punta.

Con la medición de altura de ambos métodos resulta muy importante tener un margen de error pequeño con la medición de perfil obtenida por holografía digital, debido a que el método ofrece la ventaja de no contacto, no invasivo, no destructivo y obtener mediciones en el rango de nanómetros con tan solo iluminar la muestra con luz láser de baja potencia en lugar de una punta, esto ofrece obtener datos de profundidad de manera rápida y el manejo de datos para realizar análisis cuantitativos de los datos. Además de obtener modelo 3D o topografía de la zona en estudio de la muestra.

5.4 Estructuras GaP

5.4.1 Importancia de los materiales semiconductores

El estudio de los materiales semiconductores tiene gran importancia tanto a nivel científico y tecnológico, ya que son fundamentales en la tecnología de hoy, y son la base en la fabricación de circuitos integrados, transistores, leds y procesadores de computo. Por lo que desarrollar un método de medición de no contacto sobre el material semiconductor tiene una gran relevancia debido a que abre la puerta al desarrollo a aplicaciones en tiempo real y el estudio de otros parámetros físicos de los materiales semiconductores.

La muestra en estudio es una estructura GaP, para aplicaciones detección y o generación de luz, cuya estructura es como se muestra en la Figura 5.09.

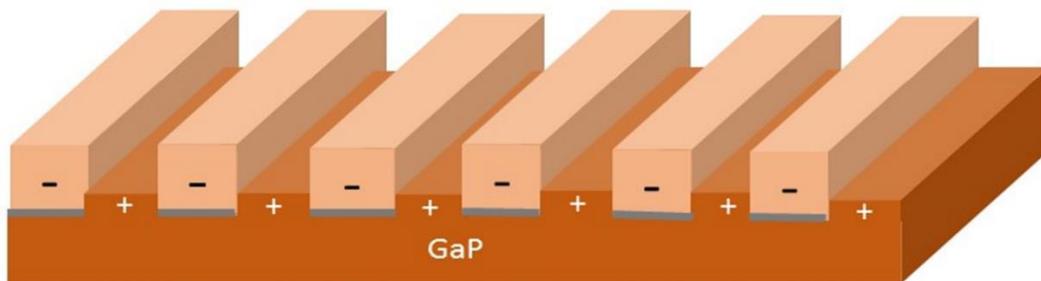


Figura 5.09. Estructuras GaP cuyo relieve son franjas un sustrato de GaP.

En la región de la muestra (+) es fosfuro de galio (GaP), la zona intermedia es silicio de germanio (SiGe) (Si 0.9 Ge 0.1). La región (-) de la estructura está compuesta por diversas capas de materiales, se describen en detalles esta estructura en la referencia [34], la composición predominante en la región (-) es GaP. La región (+) se considera solo GaP. La muestra está crecida sobre un material opaco por lo que la luz es reflejada.

La muestra está conformada por tres zonas donde la única diferencia entre ellas es lo ancho de las regiones (+) y (-) vea Figura 4.11. Las tres zonas fueron caracterizadas en altura por un perfilómetro, se obtuvieron estos datos vea la Tabla 5.3

Tabla 5.3 Caracterización de las tres zonas

Zona	Ancho de la región (+) [μm]	Ancho de la zona (-) [μm]	Altura [nm]
1	77	82	255.6
2	7.68	11.61	252.2
3	36	43	257

En este trabajo se realizó un estudio de MHD sobre las tres zonas, donde se analizó la reconstrucción de fase. Luego con los datos de fase se derivó la topografía de la muestra usando la aproximación del medio efectivo.

5.4.2 Aproximación de índice de refracción efectivo

Para poder derivar la topografía a partir de los datos de la reconstrucción de fase se considera primero que la luz atraviesa diferentes capas en la región (-) de la estructura de la Figura 5.06. La región (-) es de composición no homogénea o heterogénea.

La luz es afectada por las diferentes composiciones en la región (-) por lo tanto se debe considerar los distintos índices de refracción a lo largo de trayecto que atraviesa la luz para obtener la topografía de la zona en estudio.

Con la teoría de la aproximación del medio efectivo considera que la estructura GaP en la región (-) es un medio homogéneo, con ello la luz atraviesa este medio con un índice de refracción efectivo $n_{efectivo}$.

Para mayor simplicidad se toma la región (-) como si fuera solo GaP con un índice de refracción n_2 , el sustrato es solo de GaP con un índice de refracción n_3 . La luz interactúa en la región (-) con aire/GaP/sustrato o aire/GaP/GaP y en la región (+) aire/sustrato o aire/GaP.

Se asume que la estructura hecha de capas con diferentes materiales semiconductores se puede reemplazar por un medio homogéneo con un índice de refracción efectivo donde éste depende de la razón longitud de onda y el grosor de las diversas capas. En esta aproximación cuando la anchura de una capa es mucho más pequeña que la longitud de onda esta capa puede ser negada.

Para el caso de una estructura formada de tres capas en este caso aire/GaP/GaP el índice de refracción efectivo está dado por [38]:

$$n_{efectivo} = \begin{cases} \frac{1}{2} \left[n_1 + n_2 \frac{h}{\lambda} + \left(1 - \frac{h}{\lambda} \right) n_3 \right], & \text{región (-),} \\ \frac{n_1 + n_3}{2}, & \text{región (+).} \end{cases} \quad (55)$$

Para esta estructura, donde $h \leq \lambda$, y h es la altura de la región (-), $h \approx 255nm$ (por el perfilómetro). Para obtener la topografía por MHD, partiendo de la consideración de la ecuación 49 (capítulo 3) y que para este caso la luz se propaga en un medio homogéneo con un índice de refracción efectivo, tenemos [18]:

$$h(x, y) = \frac{\lambda \varphi(x, y)}{4\pi n_{efectivo}}. \quad (56)$$

5.4.3 Proceso de reconstrucción de los hologramas digitales de GaP

La muestra se colocó porta muestra del microscopio holográfico digital. La longitud de onda utilizado fue $\lambda=543\text{nm}$. El objetivo de microscopio utilizado para el experimento fue 20X, teniendo una magnificación lateral de $G= 15.32$. Estos son los mismos parámetros de las para el estudio de las tres zonas.

En la Figura 5.10 se muestra el proceso de reconstrucción del holograma digital de la primera zona 1 en estudio.

El holograma digital de estructura GaP de la zona 1 se muestra en la Figura 5.10(a) y en la Figura 5.10(b) se muestra un zoom del holograma digital donde se observa las franjas de interferencia. El valor para corregir la curvatura de esta muestra es $r'' = 2.5 \text{ cm}$. El espectro angular se muestra en la Figura 5.10(c). Para centrar la región +1 en el centro de las frecuencias espaciales los valores de prisma son $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = -43.5 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = 62.5 \text{ pixeles}$, para luego ser filtrado con un pasa bajos, con una frecuencia de corte de $fc = 2.8\%$. Esto se muestra en Figura 5.10(d).

Para obtener la reconstrucción del frente de onda en el plano optimo P', la distancia de reconstrucción $z'_{p'}$, se obtuvo con los siguiente parámetros $N = 60$, tamaño del salto $\Delta z' = 35\mu\text{m}$ donde la imagen se reconstruye cuando $n = 43$ por lo que la distancia de reconstrucción en el plano optimo fue $z'_{43} = z'_{p'} = 455\mu\text{m}$. La reconstrucción de intensidad se muestra en la Figura 5.10(e), mientras la reconstrucción de fase en la Figura 5.10(f).

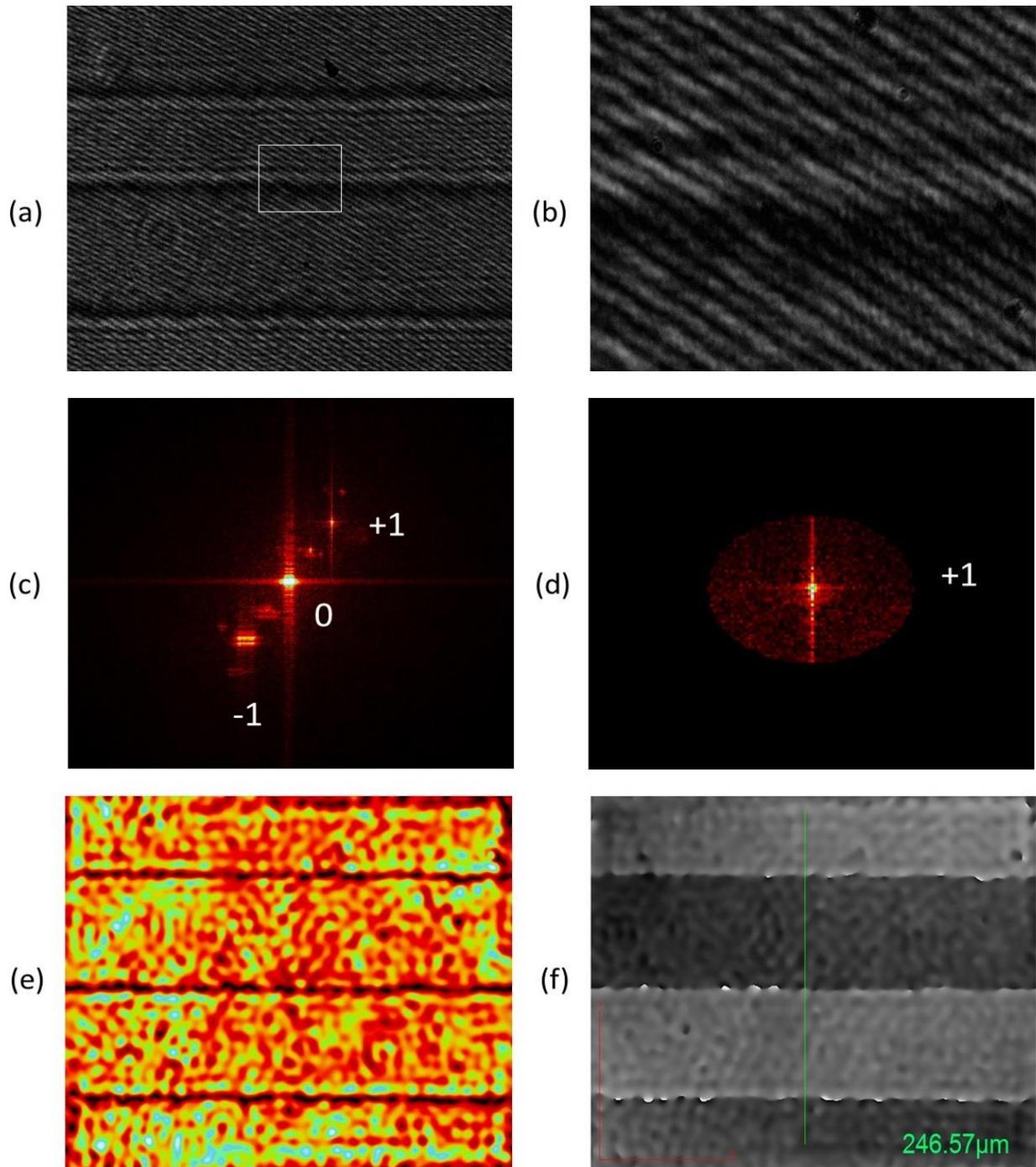


Figura 5.10. Reconstrucción de un holograma digital de la estructura GaP. (a) Holograma digital. (b) zoom del recuadro blanco de (a). (c) Espectro angular del holograma. (d) Término +1 Filtrado. (e) Reconstrucción de intensidad. (f) Reconstrucción de fase.

La segunda zona de estudio se diferencia de la primera, en los tamaños de las regiones (+) y (-) son más estrechos. En la muestra son los más pequeños a estudiar.

En la Figura 5.11 se muestra el proceso de reconstrucción de la segunda zona de la muestra de las estructuras GaP. En donde la Figura 5.11(a) se muestra el holograma, y en la Figura 5.11(b) se muestra un zoom del holograma donde se observa las franjas de interferencia. El valor para corregir la curvatura de esta muestra es $r'' = 2.5 \text{ cm}$.

El espectro angular se muestra en la Figura 5.11(c) en este caso se observa un espectro angular en donde además de las frecuencias de los términos de difracción +1, 0, -1 se observan un patrón de frecuencias característico a la transformada de Fourier de una rejilla en los tres términos.

Con valores de prisma $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = -62.3 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = 61 \text{ pixeles}$ se centra la región +1 en el centro de las frecuencias centrales para ser filtrado con un filtro pasa bajos rectangular cuyos límites inferior y superior son en $\frac{k'_x}{\Delta k'_x} [1266,1294] \text{ pixeles}$ y $\frac{k'_y}{\Delta k'_y} [827,1093] \text{ pixeles}$ con esto la región queda filtrado vea Figura 5.11(d). Esta clase de filtro es esencial sino se quiere perder información importante debido a que este patrón de frecuencias es pertenece al detalle del relieve de la muestra en estudio [39].

Los parámetros para reconstruir el campo en el plano optimo P' usando la ecuación 54 fueron $N = 60$, tamaño del salto $\Delta z' = 5 \mu m$ donde la imagen se reconstruye cuando $n = 42$. Por lo que la distancia de reconstrucción en el plano optimo fue $z'_{42} = z'_{p'} = 60 \mu m$. La reconstrucción de intensidad se muestra en la Figura 5.11(e) en ella se observa los bordes de las estructuras, la reconstrucción de fase se muestra en la Figura 5.11(f).

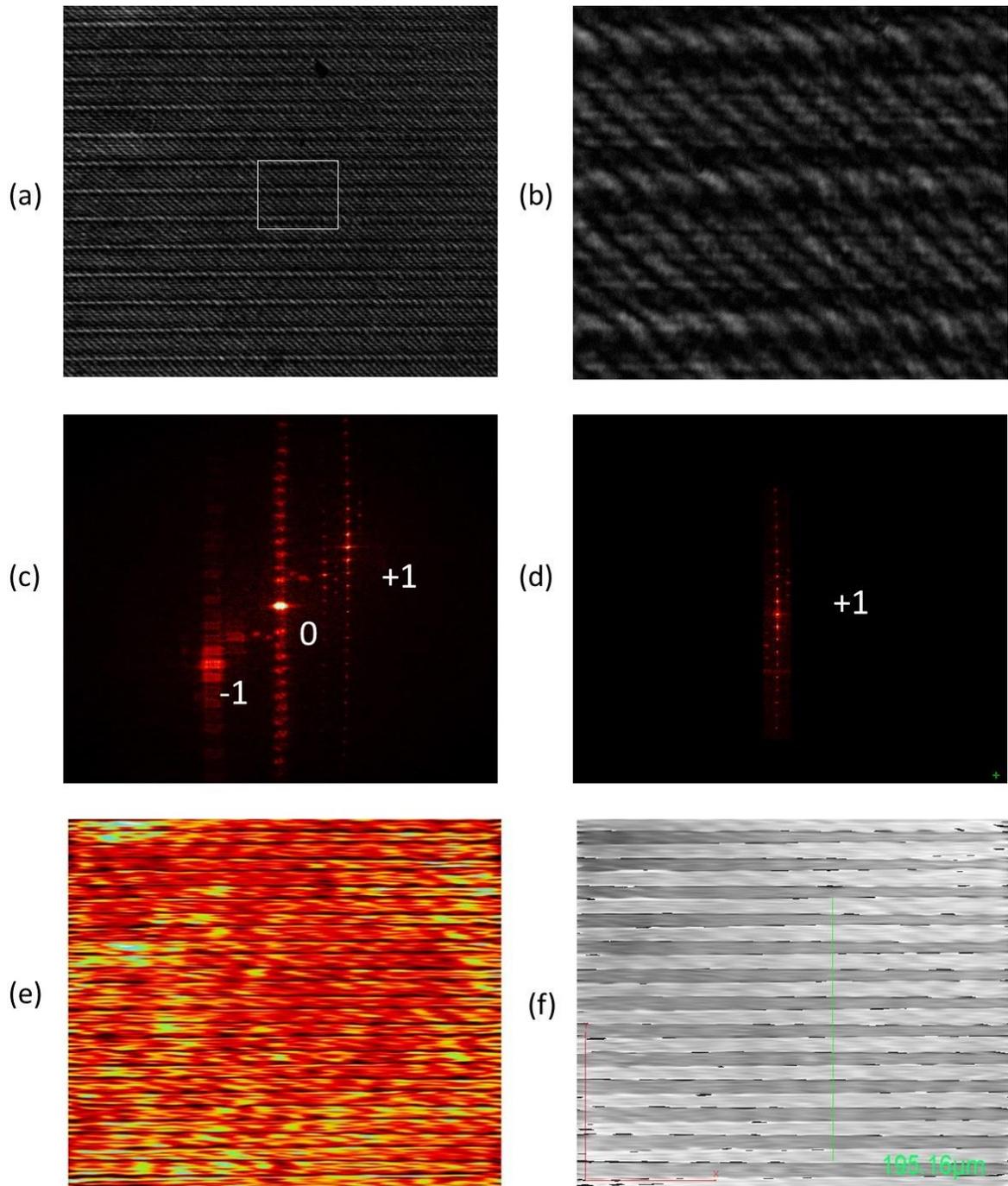


Figura 5.11. Reconstrucción de un holograma digital de la estructura GaP. (a) Holograma digital. (b) Zoom del recuadro blanco de (a). (c) Espectro angular del holograma. (d) Término +1 filtrado con un filtro rectangular. (e) Reconstrucción de intensidad. (f) Reconstrucción de fase.

La tercera zona de estudio se diferencia de la primera y de la segunda en el tamaño de los anchos de las regiones (+) y (-), en relación estos son los intermedios de la muestra. En la Figura 5.12 se muestra el proceso de reconstrucción de la tercera zona de la muestra de las estructuras GaP. En donde la Figura 5.12(a) se muestra el holograma digital, y en la Figura 5.12(b) se muestra un zoom de esta. El valor para la corrección de curvatura fue $r'' = 4.8 \text{ cm}$.

El espectro de frecuencias espaciales se muestra en la Figura 5.12(c), los valores para centrar la región de frecuencias espaciales +1 fueron $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = -78.85 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = 26.9 \text{ pixles}$ y como en el caso anterior se implementó un filtro pasa bajos bajo rectangular para filtrar la región +1 esto para evitar perdida de información de la topografía de la muestra vea Figura 5.12(d).

La distancia de reconstrucción fue $z'_{53} = z'_{p'} = 115 \mu m$ con parámetros $N = 60$, $\Delta z' = 5 \mu m$ con valor de $n = 53$ se obtiene el frente de onda con lo cual se obtiene la reconstrucción de intensidad y fase Figura 5.12(e) y Figura 5.12(f).

5.4.4 Resultados

Con la reconstrucción de fase vea Figuras 5.10(f), Figura 5.11(f), Figura 5.12(f) se obtuvo un perfil de fase de éstas. De esta manera se puede comparar la variación de fase principalmente en la región (-) debido a que la luz es afectada por diferentes índices de refracción de cada capa que atraviesa.

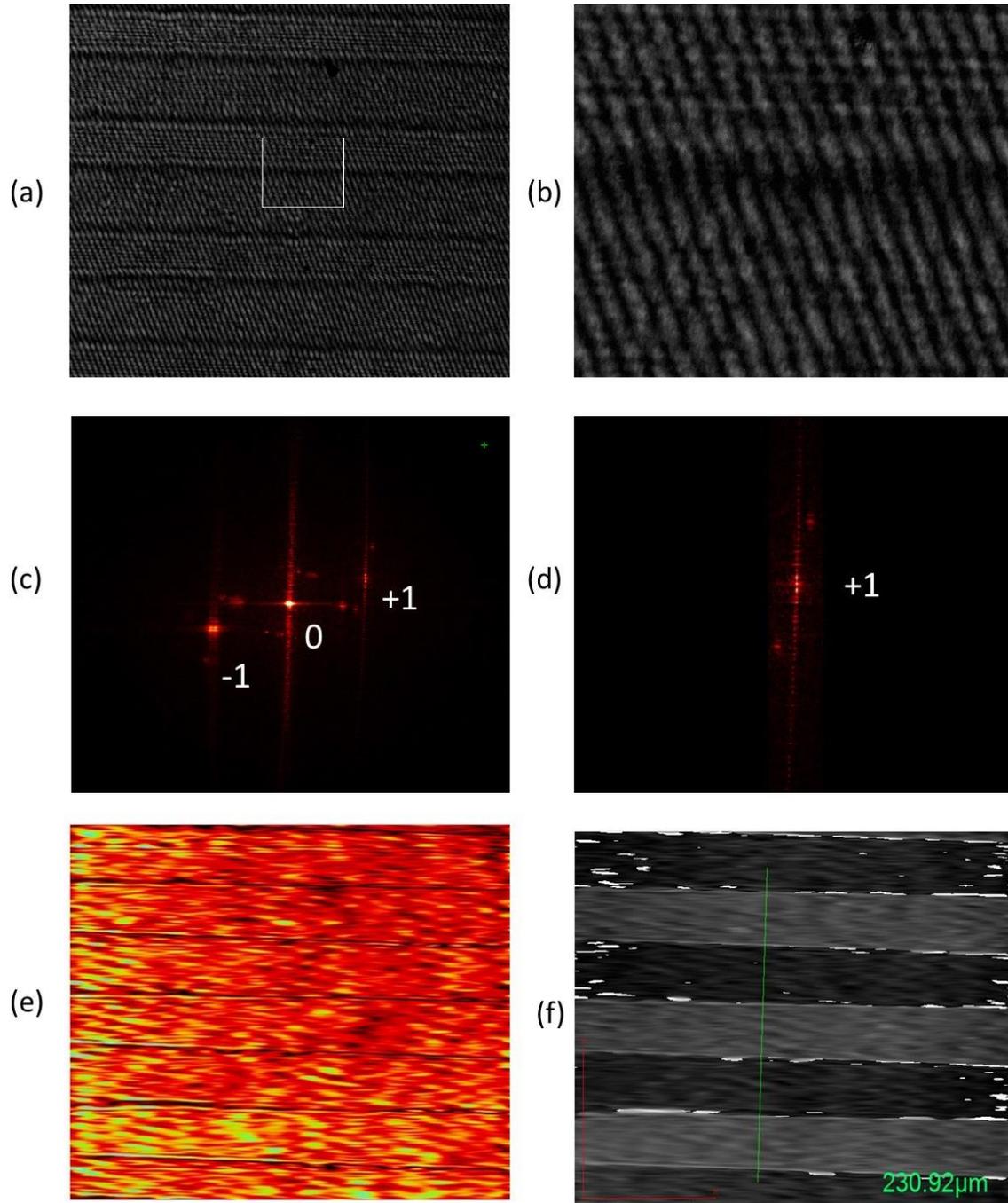


Figura 5.12. Reconstrucción de un holograma digital de la estructura GaP. (a) Holograma digital. (b) Zoom del recuadro blanco de (a). (c) Espectro angular del holograma. (d) Término +1 filtrado con un filtro rectangular. (e) Reconstrucción de intensidad. (f) Reconstrucción de fase.

En la Figura 5.13 se muestran los perfiles de fase obtenidos por el método, donde se observa el cambio de fase en la región (+) y la región (-) para las tres zonas en estudio.

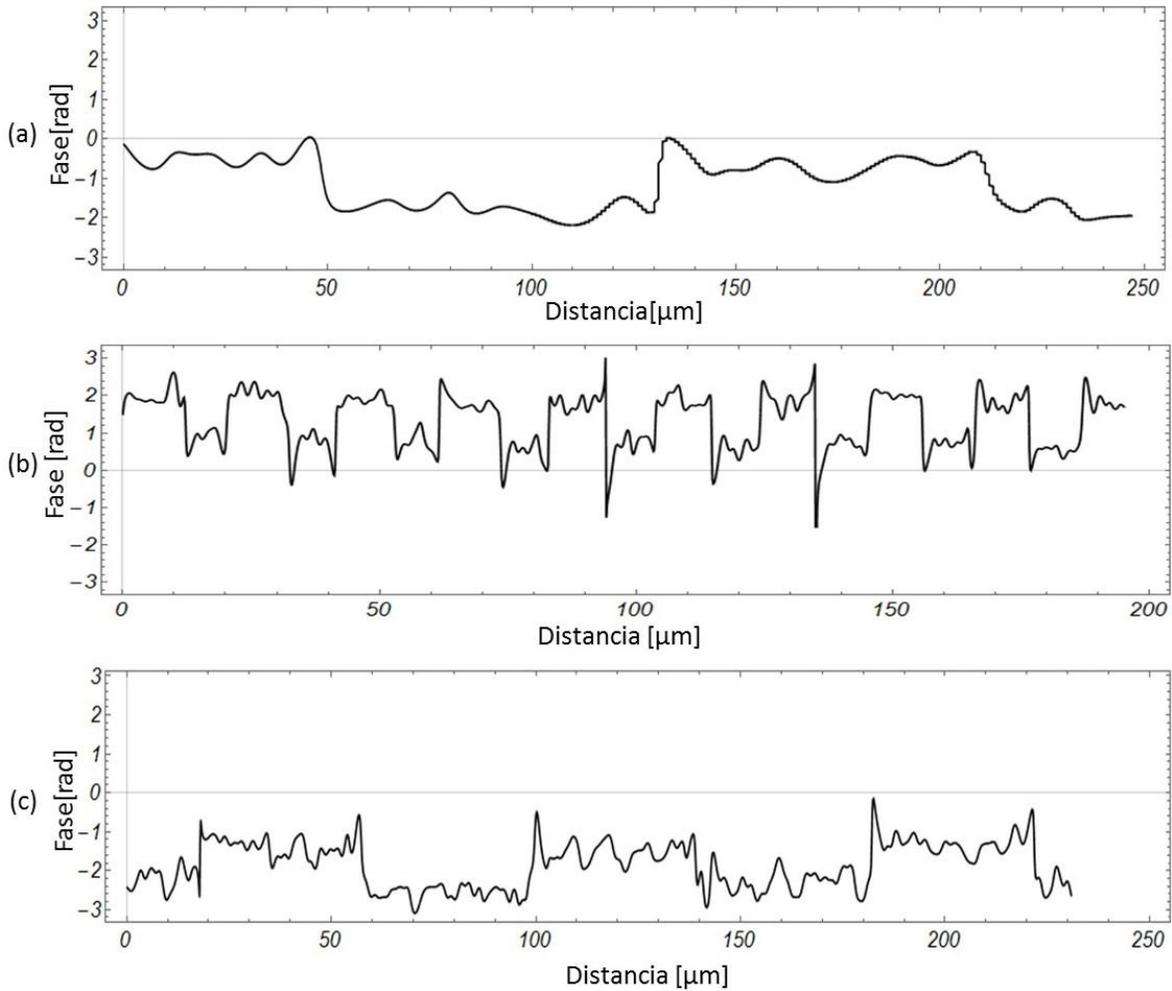


Figura 5.13. Graficas de perfil de fase donde se observa el cambio de fase en las regiones (-) y (+).

Para obtener la variación de altura se utilizó la aproximación medio efectivo considerando n_1 es el índice de refracción del aire, $n_2 = n_3 = 3.46$ para GaP obtenido con $\lambda=543\text{nm}$ valor obtenido de la literatura y n_2 es usado como índice efectivo en la región (+). Con estos valores se calcula la variación de altura h ecuación 56 a partir de un índice de refracción efectivo. En la figura 5.14 se muestra los perfiles de las tres zonas en estudio.

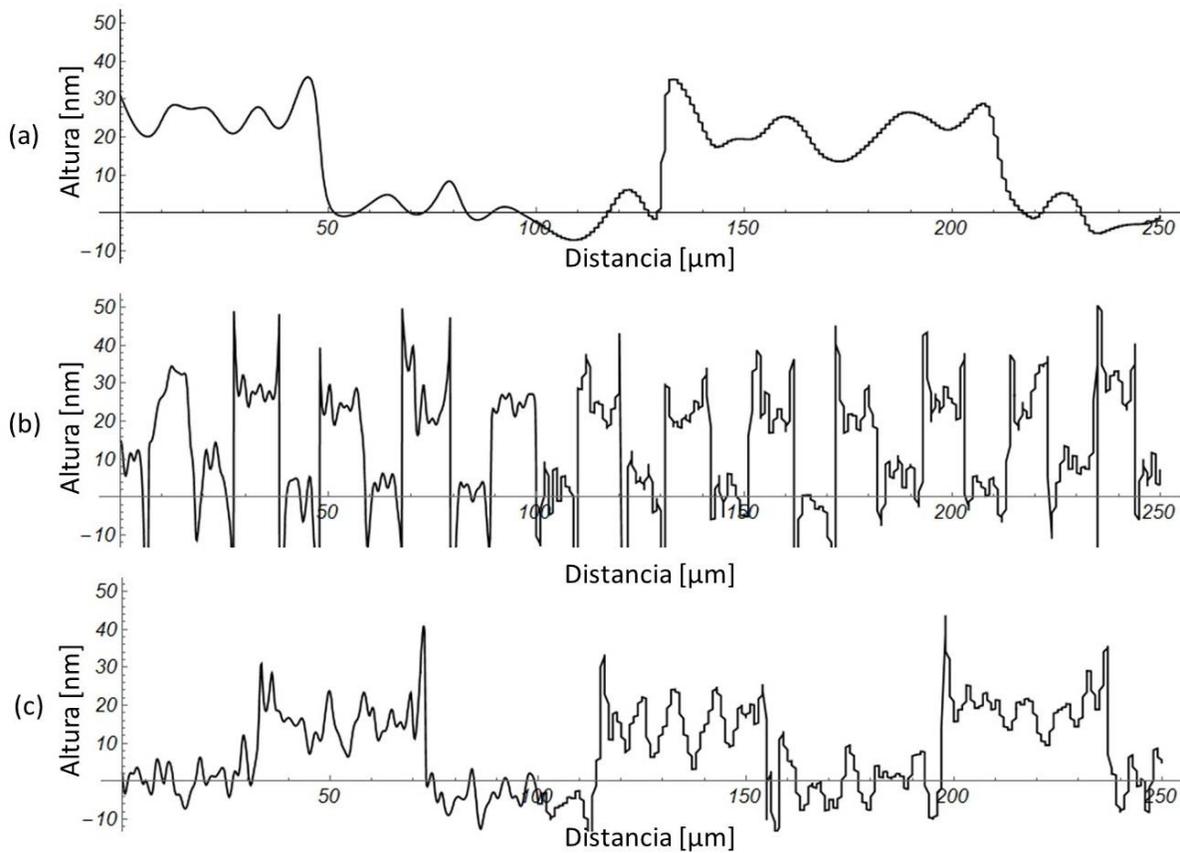


Figura 5.14. Medición de perfil donde (a) perfil de la zona 1, (b) perfil de la zona 2, (c) perfil de la zona 3.

En la siguiente Tabla 5.4 se muestra la información obtenida de las gráficas de la Figura 5.13 y Figura 5.14.

Tabla 5.4. Datos obtenidos de la estructura GaP en las tres zonas.

Zona	Ancho de la región (+) [μm]	Ancho de la zona (-) [μm]	Altura [nm]
1	83.6	80.1	22.44 \pm 5.0
2	9.7	10.9	25.81 \pm 5.1
3	39.5	41.8	18.93 \pm 4.1

Con la esta informacion se muestra los modelos 3D de la topografía estructura GaP de la zona 1 y zona 2 vea la Figura 5.15.

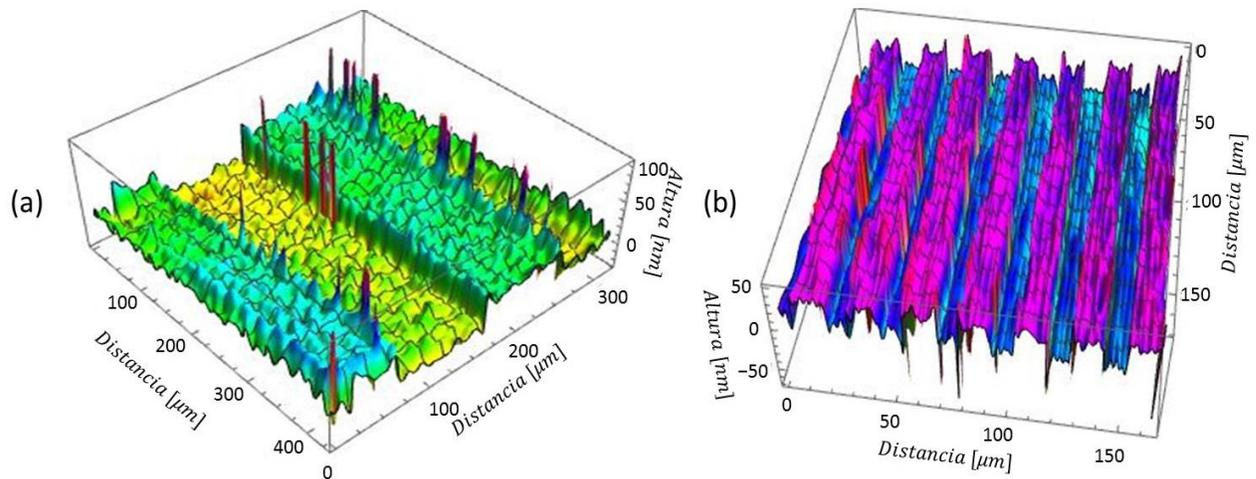


Figura 5.15. (a) Topografía de zona 1. (b) Topografía de la zona 2 de la estructura GaP.

5.4.5 Análisis de resultados y conclusiones

En la Figura 5.13 se muestran las graficas donde se observa el cambio de fase entre las regiones (+) y (-) donde este cambio es provocado debido al cambio de fase que afecta a la luz al atravesar las diferentes capas en la region (-) de la estructura GaP. Por lo cual es congruente este resultado en la reconstrucción fase.

Las dimensiones de las regiones (-) y (+) de Tabla 5.4 a comparacion de la las mediciones obtenidas en la Tabla 5.3 son similares.

En la Tabla 5.4 se muestra el valor promedio de la altura la zona 1 y la zona 3 tiene un valor promedio similares, mientras que en los de la zona 2 el valor promedio es un poco mayor considerando que las alturas de las tres zonas son similares vea Tabla 5.3.

Los valores de altura presentados en la Tabla 5.4 en relación de los valores del perfilómetro de la Tabla 5.3 no son los valores correctos en altura, esto puede ser por varias causas:

- El modelo de la aproximación del índice de refracción efectivo no es adecuado para describir de manera satisfactoria la propagación de la luz en este medio no homogéneo, para el caso particular de la holografía digital.
- Cuando se reconstruye el frente de onda complejo de una muestra compuesta de diversas capas, la fase ya no es proporcional de manera directa a la topografía debido a que frente de onda es alterado a múltiples reflejos entre las interfaces de las capas de la muestra [40].
- El método de reconstrucción numérica presentado aquí no es apropiado para esta clase de estructura heterogénea. En holografía digital se ha propuesto un método de reconstrucción para resolver este tipo de problemas, la técnica se denomina *reflectometría holográfica digital* [40,41].

Realizar un análisis en la reconstrucción en fase puede resultar viable, debido a que los datos de fase muestran que método reconstrucción numérica propuesto puede diferenciar las regiones de la estructura transparente GaP como en el caso donde se observa en las grafica de la Figura 5.13 donde las estructuras (+) y (-) son detectados, además recordando que tiene diferentes composiciones de materiales semiconductores. Lo que abre la posibilidad de realizar otra clase de experimentos como por ejemplo a variaciones de temperatura para observar la expansión del material en tiempo real y cómo el índice de refracción de cada capa en la región (-) se ve afectada por una variación de temperatura, etc. Debido a que cada material reacciona diferente a cambios de temperatura el frente de onda complejo reflejado también mostraría cambios.

5.5 Níquel/Silicio

5.5.1 Estructura Níquel /Silicio

La estructura del níquel en silicio es como en la Figura 5.16.

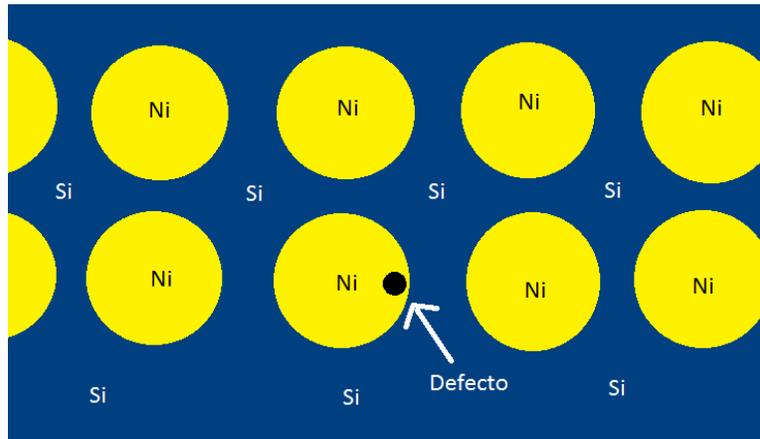


Figura 5.16. Se muestra gráficamente la muestra en estudio donde se examinará algo similar a gotas o discos de níquel sobre una capa de silicio, cuyo diámetro es de aproximadamente 1mm.

En esta estructura se tiene una capa de silicio en la cual se ha crecido discos de níquel. En este caso tenemos una interface semiconductor-metal [42].

El objetivo de este tipo de estructura es disipar el exceso de calor de un dispositivo, debido a que la temperatura afecta a los materiales semiconductores y por ende el rendimiento de transistores, circuitos integrados, leds, se ve comprometido. Esta estructura es ideal para caracterizarla por medio MHD.

En la muestra tenemos distintas zonas donde está el níquel, pero solo se realizará estudio en una en específico. Además de poder distinguir de las demás se escoge una con un defecto en particular como en la que se muestra a en la Figura 5.16. Este defecto también se analizará.

5.5.2 Proceso de reconstrucción del holograma digital

El objetivo de microscopio empleado fue 10X, la magnificación del sistema óptico fue $G = 5.99$, debido al diámetro que abarcaba el níquel, fue necesario ajustar el montaje experimental para obtener esa magnificación lateral y poder visualizar por completo el holograma digital de la estructura del níquel en la cámara CMOS.

El holograma digital fue registrado con luz láser con una longitud de onda de $\lambda = 633\text{nm}$. La curvatura se corrige con valor de $r'' = -40\text{cm}$. En la Figura 5.17 se muestra el proceso de reconstrucción.

En la Figura 5.17(a) se muestra el holograma de Ni/Si además se observa un defecto en particular a estudiar, en la Figura 5.17(b) se muestra zoom del holograma digital en la zona del defecto.

El espectro angular del holograma se muestra en la Figura 5.17(c), los valores de prisma para centrar la región +1 en el centro de frecuencias espaciales son $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = -196.5 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = 164.6 \text{ pixles}$, se filtra la región +1 con filtro pasa bajos con una frecuencia de corte de $fc = 4\%$ vea la Figura 5.17(d).

La distancia de reconstrucción del frente de onda fue $z'_{51} = z'_{p'} = 735\mu\text{m}$ donde $N = 60$, $\Delta z' = 35\mu\text{m}$, $n = 51$. La reconstrucción de intensidad se muestra en la Figura 5.17(e) donde además se muestra el ROI para calcular el diámetro de la esfera de níquel, cuyo valor es de $735\mu\text{m}$, también se puede observar el defecto sobre el níquel.

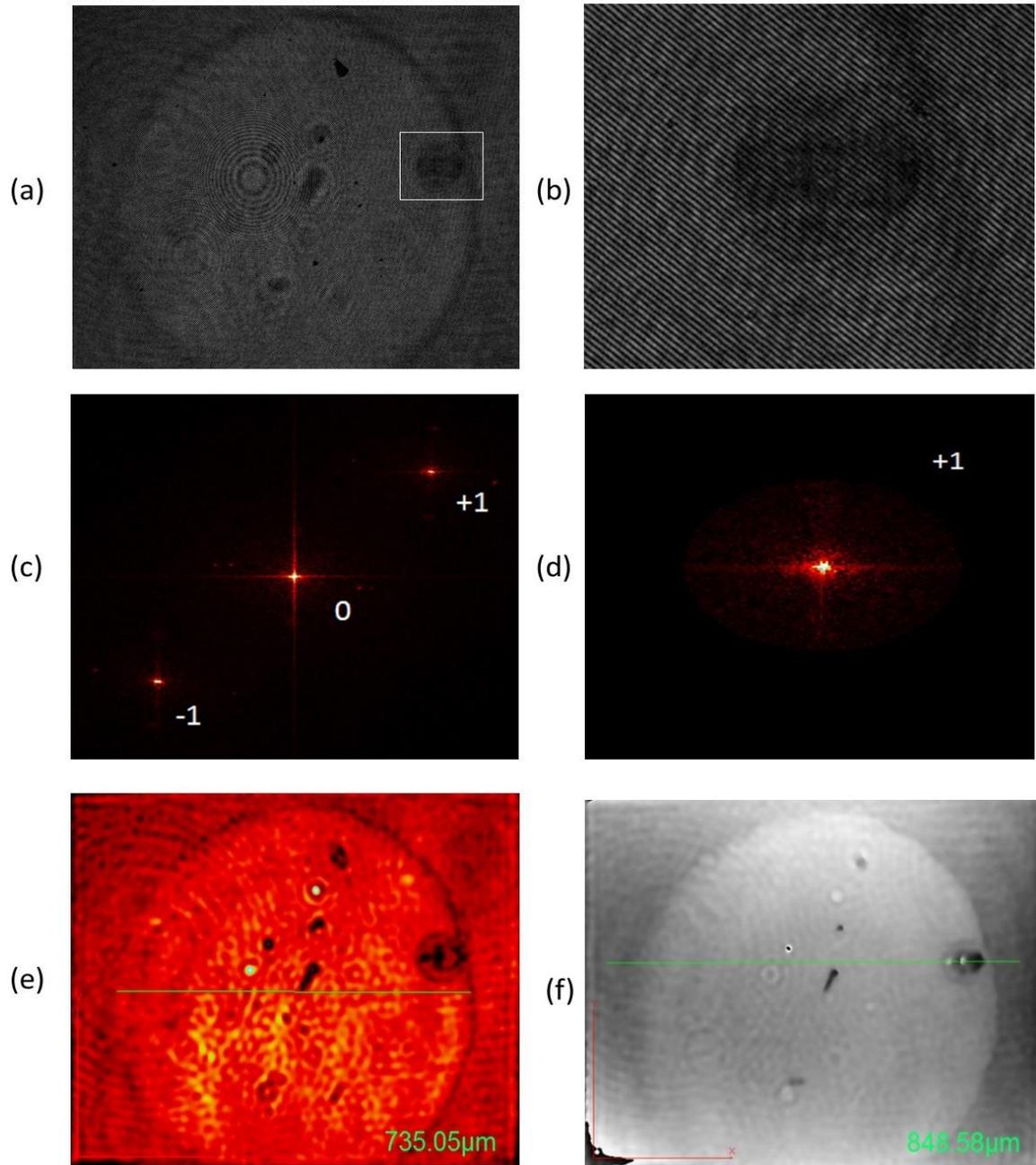


Figura 5.17. Reconstrucción del holograma digital de la muestra Ni/Si. (a) Holograma digital. (b) Zoom del recuadro blanco de (a) donde además se muestra el defecto a analizar. (c) Espectro angular del holograma. (d) Término +1 filtrado con un filtro pasa bajos. (e) Reconstrucción de intensidad con medición de diámetro de la disco de níquel. (f) Reconstrucción de fase.

5.5.3 Resultados

La reconstrucción de fase se muestra en la Figura 5.17f donde se obtiene el perfil de la muestra en la gráfica de la Figura 5.18.

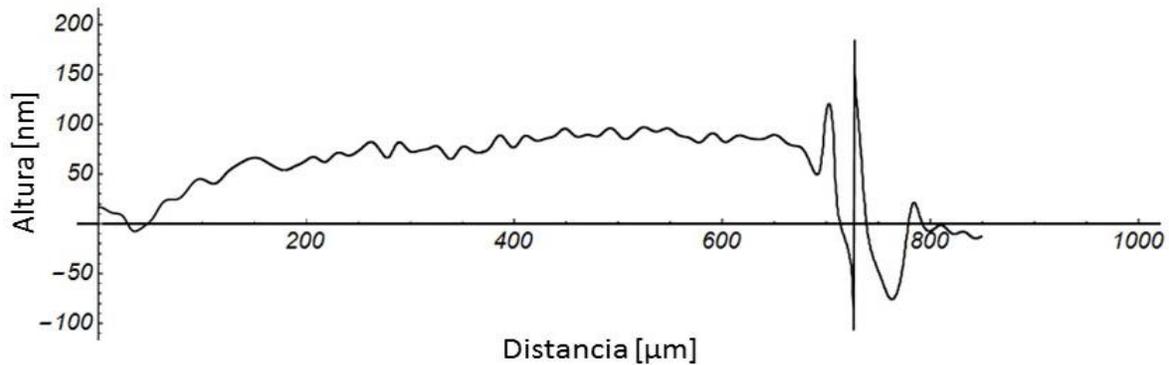


Figura 5.18. Medición de perfil obtenida.

También se realizó una medición de perfil con un perfilómetro, lo cual tuvo mucha importancia la selección de un disco de níquel con una peculiaridad vea la gráfica de la Figura 5.19.

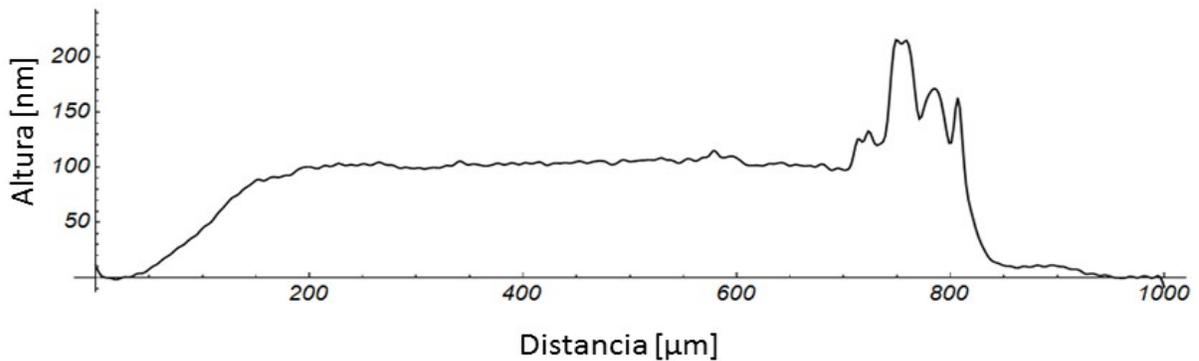


Figura 5.19. Medición de perfil hecha con el perfilómetro.

La altura de la estructura del níquel obtenida por perfilómetro es un poco mayor a 100nm, mientras que la altura de perfil hecha con MHD es aproximadamente 100nm, pero con la diferencia de la medición es ascendente mientras la medición del perfilómetro la altura se mantiene constante.

5.5.4 Análisis de resultados y conclusiones

En las gráficas de las Figura 5.18 y Figura 5.19 se muestra la altura de la estructura del níquel sobre el silicio donde se obtuvieron resultados cercanos. La elevación del níquel obtenida por perfilómetro es mayor a 100nm, mientras la medición por MHD alcanza esa altura en determinada distancia. Las razones del porque no es constante es debido distintos factores, la primera es el campo de visualización a que la magnificación lateral del arreglo experimental es pequeña, lo cual la cámara registra una mayor área del holograma digital, por lo que la corrección de curvatura posiblemente no sea la adecuada, y el segundo motivo es registrado un mayor rango de imperfecciones ópticas del objetivo o de los elementos ópticos utilizados en el montaje experimental.

Ahora se analizará el defecto particular en la Figura 5.16 se muestra gráficamente el defecto escogido, en el holograma digital se observa el níquel posee una mancha oscura, el zoom de la Figura 5.17(b), además una microfotografía (sin interferencia) fue tomada sobre este defecto esto se muestra en la Figura 5.20(a), además también se muestra un zoom del defecto en la reconstrucción de intensidad vea la Figura 5.20(b).

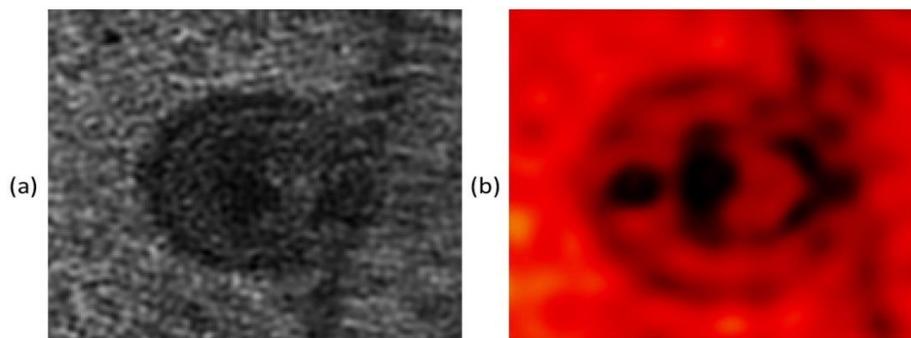


Figura 5.20. (a) Microfotografía del defecto en el níquel, (b) zoom en la reconstrucción de intensidad sobre el defecto en el níquel.

La medición de perfil de la Figura 5.18 se observa que los datos de altura sobre el defecto que esta a una distancia entre $700\text{--}800\mu\text{m}$, se detecta un pozo con una depresión de -50 a -100nm con un pico sobre saliente de 150nm . Mientras que en la grafica de la Figura 5.19 el defecto se localiza en el rango $700\text{--}840\text{nm}$. En esta medición el perfilómetro se detecto una cresta que se eleva aproximadamente 210nm . Por lo que el defecto seria una elevación sobre el níquel, las razones del porque se detecta un pozo en lugar de una elevación puede ser debido ser la dispersión de la luz en el pico. La topografía completa de la muestra Ni/Si se muestra en la Figura 5.21(a) y en la Figura 5.21(b) la topografía del defecto en estudio.

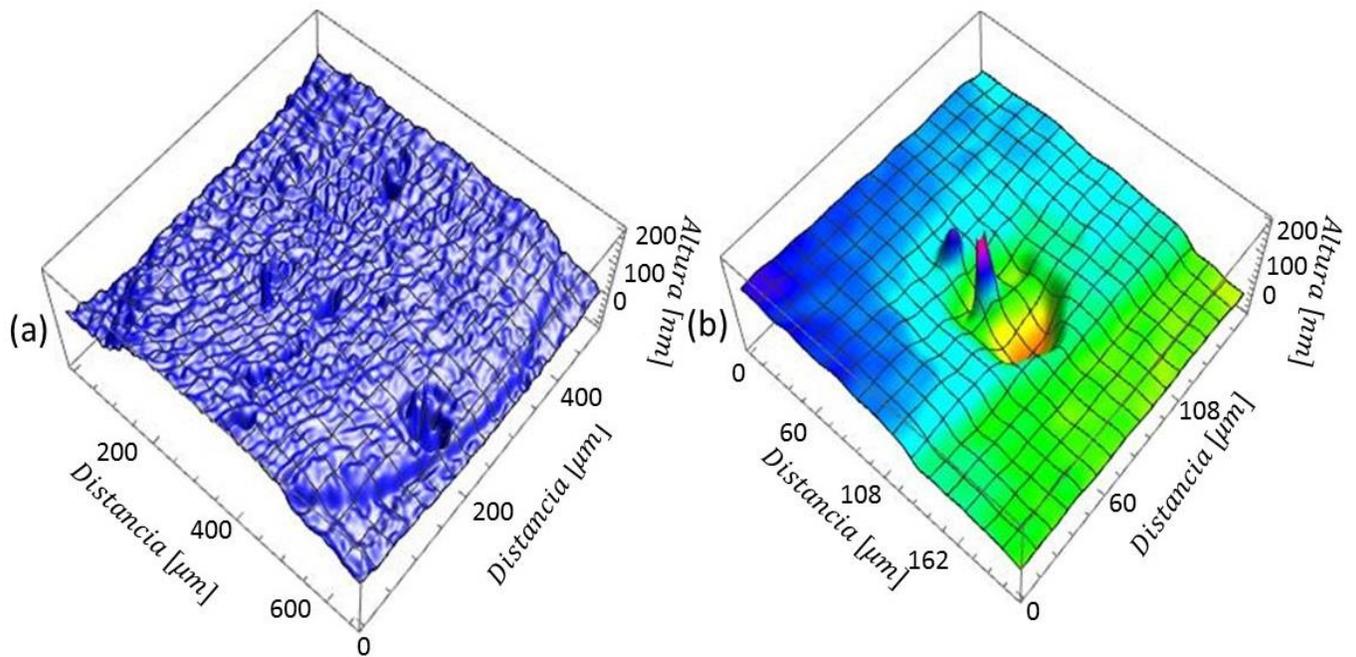


Figura 5.21. (a) Modelo 3D o topografía del níquel sobre el silicio. (b) Topografía del defecto.

5.6 Epidermis de la cebolla

5.6.1 Los alcances de la MHD en biología

Las aplicaciones de la microscopía holográfica digital tiene alcances la en biología para el estudio de microorganismos con el principal objetivo para el análisis de estructuras celulares y obtener información sobre el espesor e índice de refracción y que están directamente relacionados con densidad y concentración química. Por este motivo las investigaciones en biología han crecido de manera exponencial [8,12,36].

Se realizó un estudio sobre el tejido celular en este caso la epidermis de la cebolla vea la Figura 5.22. Probando los alcances de la metodología desarrollada en este trabajo de MHD en biología.

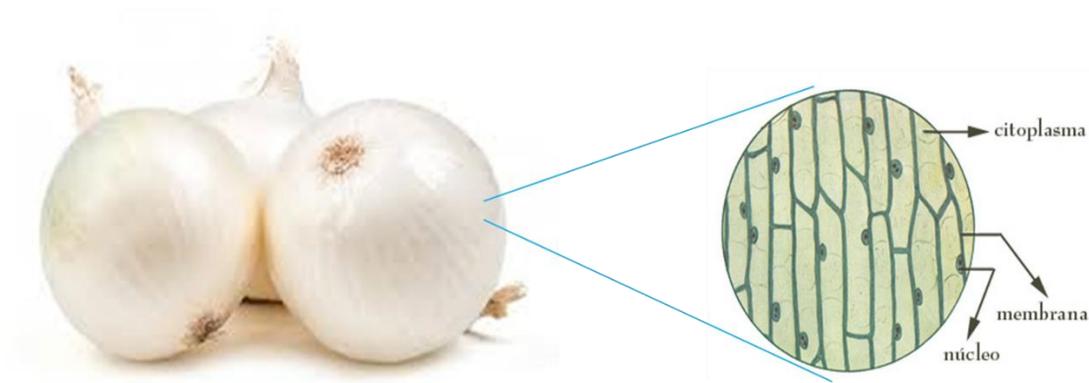


Figura 5.22. Cebollas donde se muestra la estructura de la epidermis.

El objetivo de este experimento es observar las células vegetales, poder obtener la topografía de este y realizar estimaciones de altura de las células vegetales por el método propuesto en MHD.

5.6.2 Proceso de reconstrucción del holograma digital

El tejido fue obtenido cortando de manera fina sobre una de las capas de la cebolla, y colocando el tejido en un portamuestras en el microscopio holográfico digital.

Se uso un objetivo de microscopio 20X, con una magnificación lateral $G = 14.96$, se registro el holograma del tejido vegetal con una laser sintonizable en rojo $\lambda = 633nm$, la curvatura se corrigio con un valor $r'' = 7cm$.

El holograma digital de la epidermis de la cebolla se muestra en la Figura 5.23(a), un zoom donde se muestra las franjas de interferencia se muestra en Figura 5.23(b). El espectro angular se muestra en la Figura 5.23(c) donde los términos de difracción se remarcan en un recuadro blanco, para en este caso las frecuencias espaciales se expanden debido a la topografía de la muestra.

La región de las frecuencias espaciales +1 se centró en el centro de frecuencias espaciales con valores $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = 113 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = -53 \text{ pixles}$ y se implementó en LabView un filtro rectangular en lugar de un circular para evitar perdida de información, los límites del filtro pasa bajos fueron $\frac{k'_x}{\Delta k'_x} [1224,1326] \text{ pixeles}$ y $\frac{k'_y}{\Delta k'_y} [815,1169] \text{ pixeles}$, con esto se filtró la región +1 vea esto en la Figura 5.23(d).

La distancia de reconstrucción fue $z'_{33} = z'_{p'} = 45\mu m$ donde $N = 60$, $\Delta z' = 15\mu m, n = 33$. La reconstrucción de intensidad se muestra en la Figura 5.23(e) donde se puede observar la epidermis de la cebolla además las células vegetales presentan un orden, esto es un aspecto de lo que lo diferencia de las células animal.

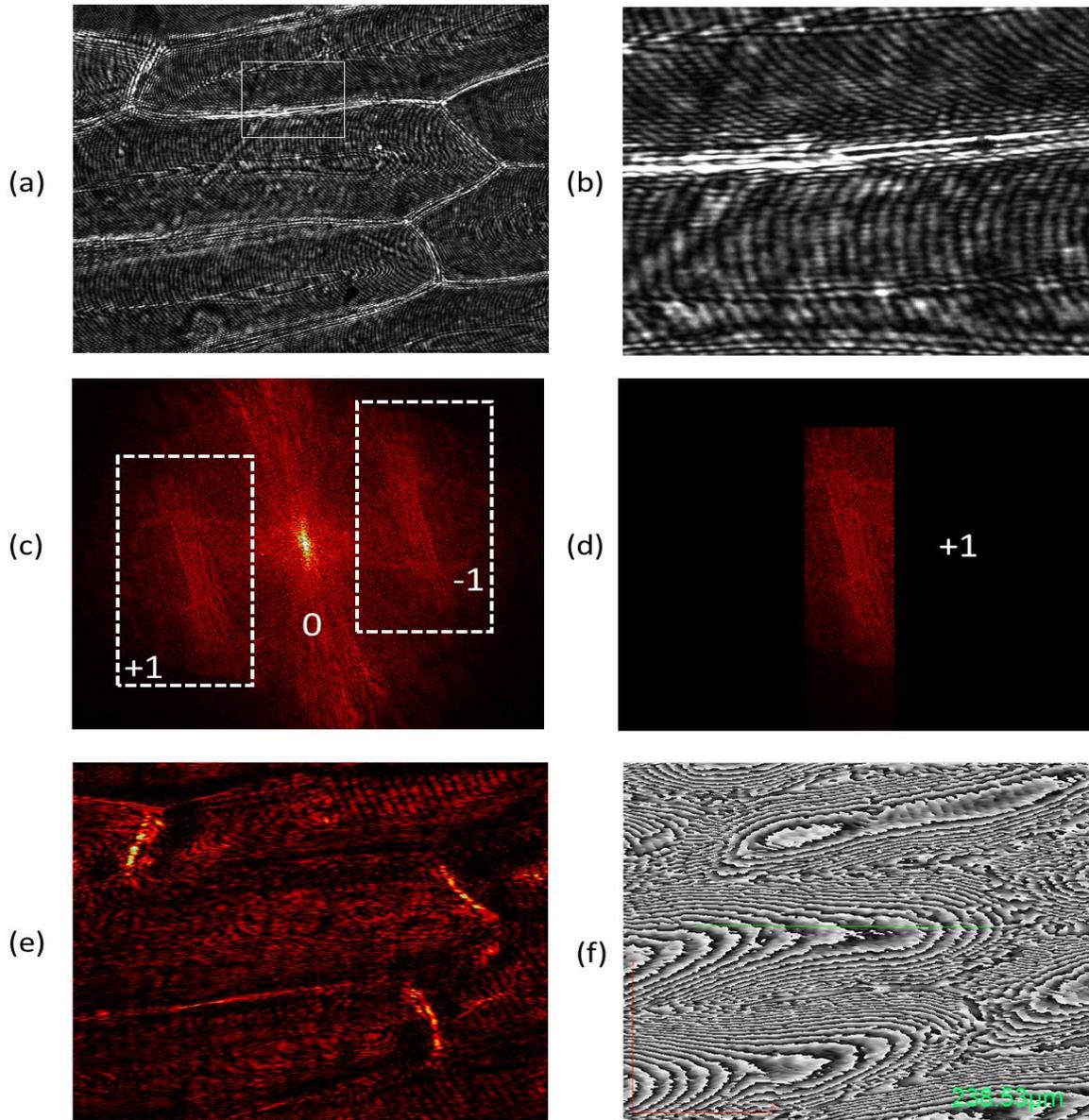


Figura 5.23. Reconstrucción de un holograma digital de la epidermis de la cebolla. (a) Holograma digital. (b) Zoom del recuadro blanco de (a). (c) Espectro angular del holograma marcando en recuadro blanco los términos de difracción +1 y -1. (d) Término +1 filtrado con un filtro rectangular pasa bajos. (e) Reconstrucción de intensidad donde se muestra varias células vegetales en orden. (f) Reconstrucción de fase, donde se presenta modulación 2π .

5.6.3 Resultados

La reconstrucción de fase se muestra en la Figura 5.23(f) donde la fase se encuentra modulada, un ROI se realizó a lo largo de una de la célula vegetal obteniendo la gráfica de la Figura 5.24.

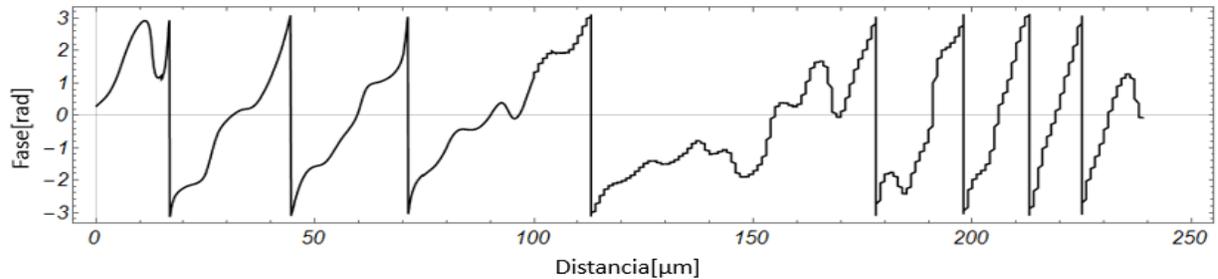


Figura 5.24. Medición de perfil de fase sobre una célula vegetal donde la fase esta modulada 2π .

Donde obtenemos un perfil con discontinuidades 2π la causa de eso es que las células vegetales tengan una altura superior a la longitud de onda grabado del holograma. Para desbloquear la fase φ_{λ_1} se empleó el desenvolvimiento por dos longitudes de onda (vea la metodología en el capítulo 3 y la referencia [12]) se registró un segundo holograma con el láser sintonizable, pero con $\lambda = 612nm$ y obteniendo un mapa de fase φ_{λ_2} vea Figura 5.25(a), la reconstrucción de este holograma digital se anexo en el apéndice A.3, la fase desbloqueada por esta técnica de desenvolvimiento se muestra en la Figura 5.25(b).

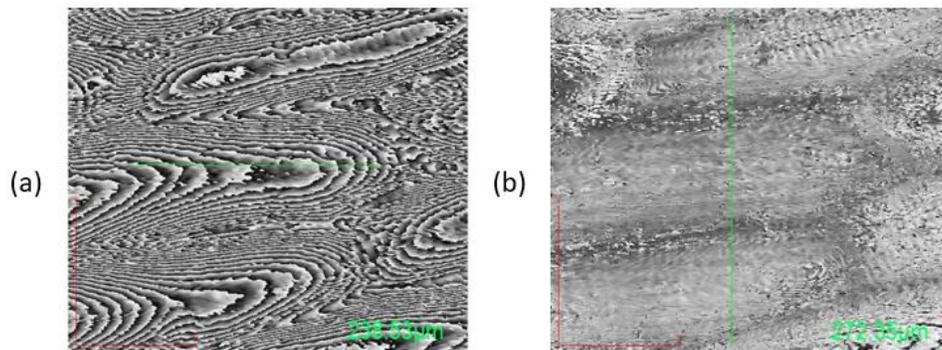


Figura 5.25. (a) Mapa de Fase φ_{λ_2} y en (b) fase desenvuelta.

Considerando que la longitud de onda sintético es $\lambda = 18.44\mu m$ se obtiene la altura a lo largo de tres células vegetales vea el perfil en la Figura 5.25(b), y la gráfica Figura 5.26.

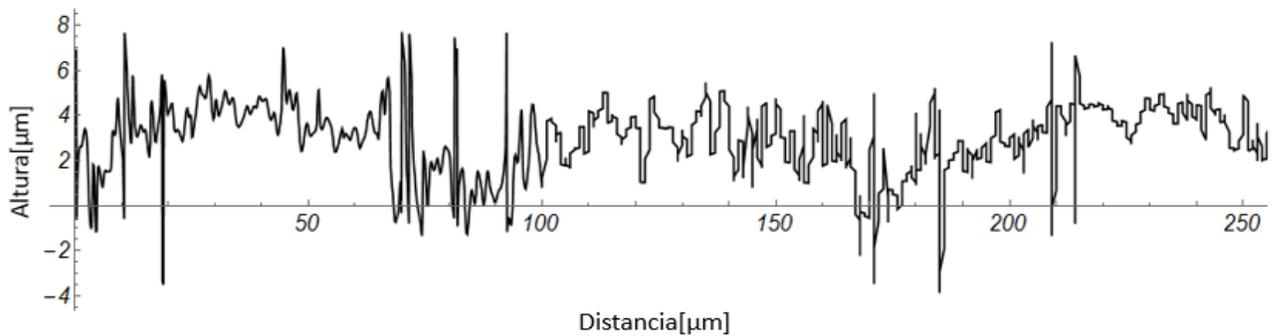


Figura 5.26. Perfil de la epidermis de la cebolla donde el perfil cruza tres células de manera vertical a estas.

5.6.4 Análisis de resultados y conclusiones

En la Figura 5.26 se muestra la gráfica del perfil de la epidermis de la cebolla que corresponde la primera célula vegetal del rango 0–70μm tiene una altura aproximada de 4μm, mientras la segunda del rango 80–170μm tiene una elevación aproximada de 3μm y finalmente la última posee una altura de 4 a 5μm. El poder medir este tipo de tejidos vegetales proporciona a la biología una alternativa para obtener información de topografía celular sin necesidad de utilizar puntas u otro medio destructivo sobre la muestra biológica.

5.7 Célula epitelial de la mucosa

5.7.1 La MHD y técnicas de contraste de fase para el estudio de microorganismos

La MHD es una técnica para la obtención de imágenes de contraste de fase, lo cual permite obtener datos de fase de cualquier cuerpo transparente, por lo cual la técnica resulta ser atractivo para campos relacionados al estudio de microorganismos vivos.

La MHD a diferencia de otras técnicas ópticas no requiere alterar el espécimen biológico para obtener mejor visibilidad de las partes internas, aplicando procesos químicos que colorean al espécimen para obtener una mejor visibilidad de este.

Técnicas de contraste de fase como como Zernike, Normarsky y la microscopía de campo oscuro, han desarrollado y mejorado la visibilidad sin alterar el espécimen, pero tiene la desventaja de no poder obtener una imagen de contraste de fase de manera directa como en MHD [8,12,25,32,43].

5.7.2 Célula de la mucosa y preparación de la muestra

La muestra que se estudiará será una célula epitelial de la mucosa de revestimiento. Esta célula se encuentra en la cara interna del labio, cara interna de las mejillas, piso de la boca, cara inferior de la lengua y paladar blando. Estas células no participan, directamente, en el fenómeno masticatorio y no tienen receptores del gusto y además tiene receptores de tacto y de dolor [44,45]. En la Figura 5.27 se muestra una célula epitelial desde microscopio óptico visible debido a un proceso de coloreado.

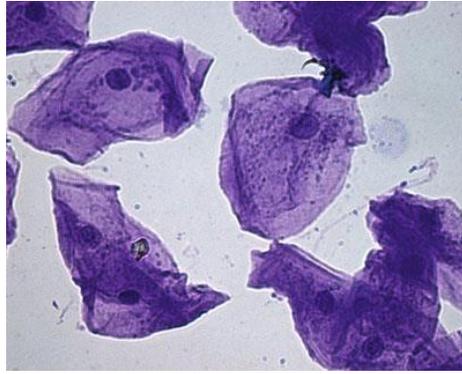


Figura 5.27. Célula epitelial de la mucosa vista desde el microscopio óptico [8].

La muestra biológica se obtuvo frotando con un palillo de madera sobre la cara interna de la mejilla para después depositarlo sobre un sustrato preparado previamente. Al sustrato previamente se le colocó una película delgada de aluminio por medio de evaporación en una campana de alto vacío. En la Figura 5.28 se muestra gráficamente el proceso de preparación de la muestra.

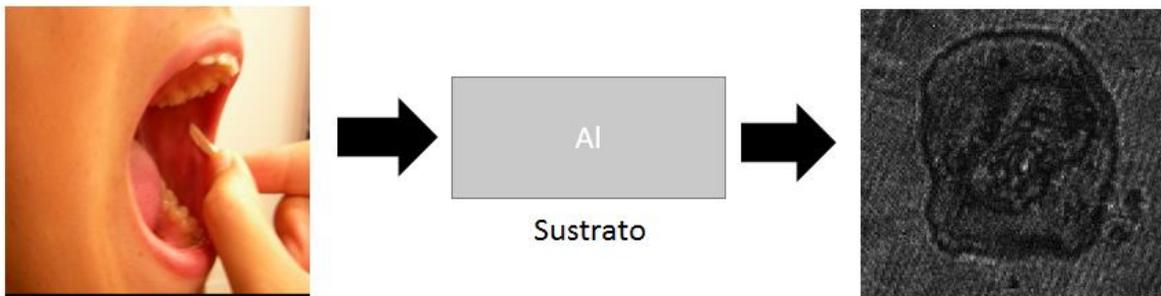


Figura 5.28. Preparación de la muestra en la imagen de la derecha es la célula de la mucosa.

El propósito de tener el sustrato con aluminio permite a que la luz viaje a través de la célula para verse reflejada completamente, debido a que la superficie del sustrato es un espejo debido al aluminio y esto refleja la totalidad de la luz para volver a retornar a través de la célula. Esto es una ventaja debido a que el montaje experimental está en modo de reflexión.

En la Figura 5.28 en la imagen de la derecha se muestra la célula que se tendrá como estudio, considerando además de que es un espécimen biológico vivo que es completamente transparente al ojo humano.

5.7.3 Proceso de reconstrucción del holograma digital

Se utilizó un objetivo 20X y teniendo una magnificación lateral de $G = 20.92$ se usó luz láser rojo $\lambda = 633nm$ para el registro del holograma en la cámara CMOS. El valor de $r'' = 17cm$ es efectivo para una adecuada corrección de curvatura en el plano de la cámara. En la Figura 5.29 se muestra el proceso de reconstrucción del holograma digital.

En la Figura 5.29(a) se muestra el holograma digital, en la Figura 5.29(b) un zoom sobre el holograma digital de una célula de interés, el espectro angular se muestra la Figura 5.29(c).

La frecuencias espaciales del el término de difracción +1 se centra en el centro de las frecuencias espaciales con valores de prisma de $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = -95.4 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = -25.4 \text{ pixeles}$, para el filtrado de la región +1 de la Figura 5.29(d) el valor de la frecuencia de corte para el filtro pasa bajos fue $f_c = 4\%$.

La distancia de reconstrucción fue $z'_{25} = z'_{p'} = -30\mu m$ donde $N = 60$, $\Delta z' = 6\mu m$, $n = 25$. La reconstrucción de intensidad se observa en la Figura 5.29(e) donde se aprecian cuatro células epiteliales, un zoom en la célula de estudio se muestra en la Figura 5.29(f).

La reconstrucción de fase presenta modulación de fase vea en la Figura 5.30(a), para desenvolver la fase se usó el algoritmo de Goldstein [46] para obtener el mapa de fase desenvuelto vea Figura 5.30(b).

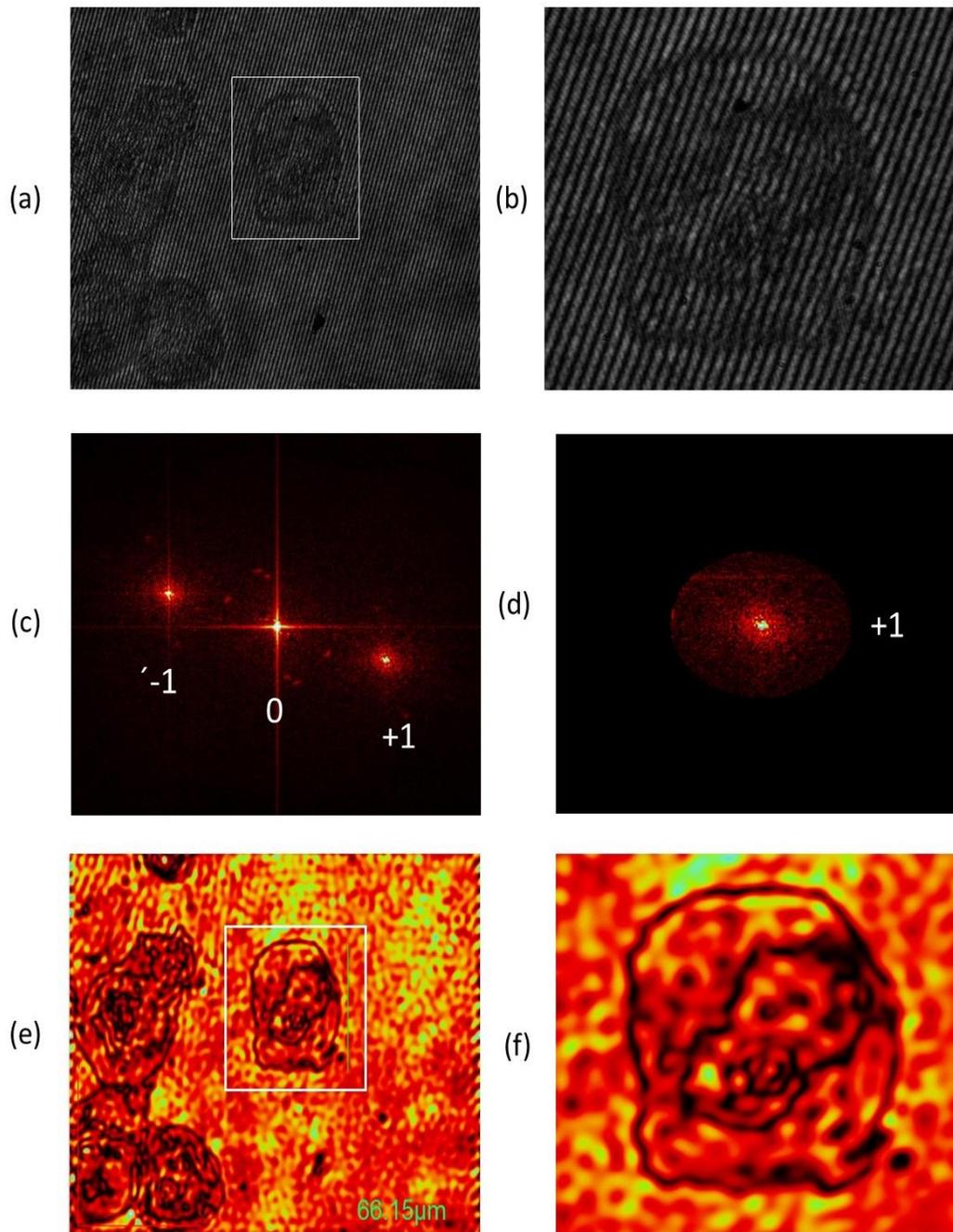


Figura 5.29. Reconstrucción de un holograma digital de la célula de la mucosa de revestimiento. (a) Holograma digital. (b) Zoom del recuadro blanco de (a) y sobre una célula. (c) Espectro angular del holograma. (d) Término +1 filtrado con un filtro pasa bajos. (e) Reconstrucción de intensidad donde se muestra varias células epiteliales. (f) Un zoom sobre una célula en particular para el análisis.

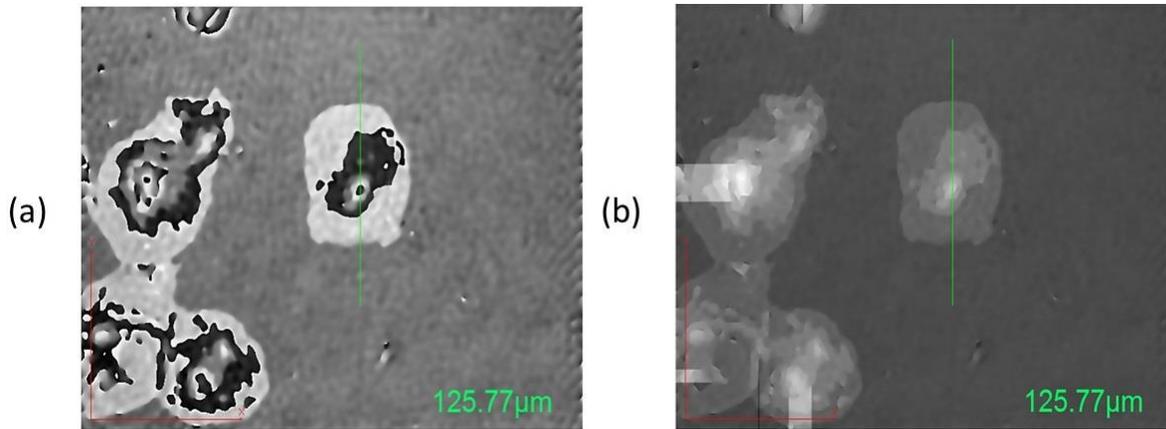


Figura 5.30. (a) Mapa de fase envuelto y en (b) mapa de fase desenvuelto por algoritmo de Goldstein.

5.7.4 Resultados

En la Figura 5.30(a) se obtuvo un perfil de fase donde se muestra la fase con discontinuidad 2π y en la Figura 5.30(b) otro perfil de fase donde se muestra la fase corregida, vea las gráficas en la Figura 5.31.

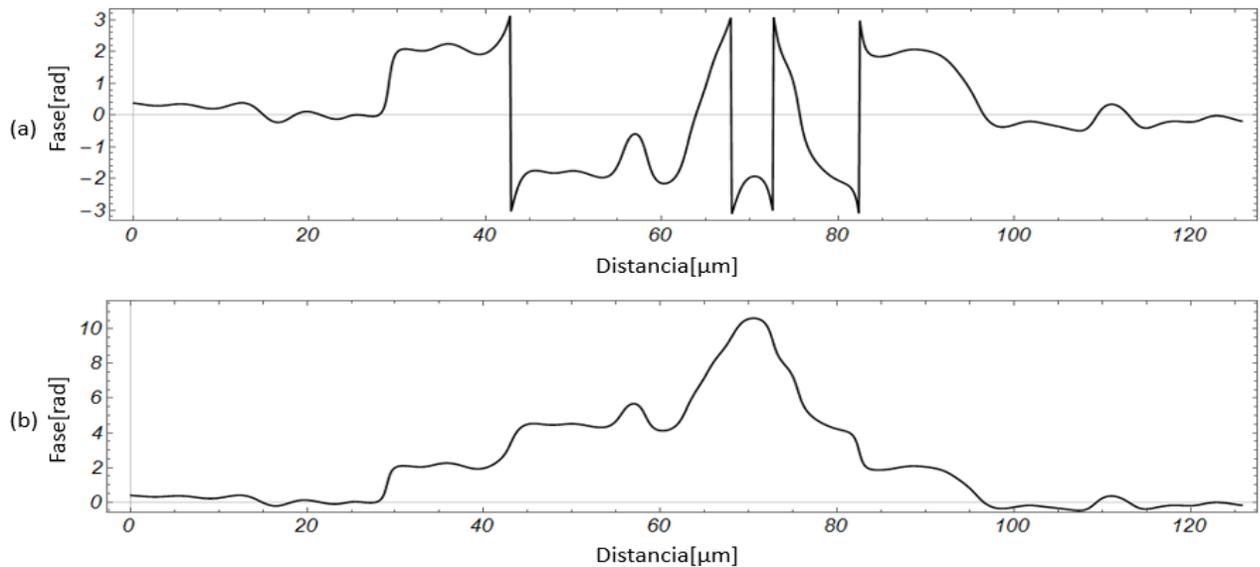


Figura 5.31. Medición de perfil de fase, donde (a) es el perfil que presente discontinuidades 2π y en (b) es el perfil corregido de (a).

Para obtener la altura de la célula a partir de la fase desenvuelta se considera que la luz atraviesa dos medios, se propaga en aire para luego propagarse en un medio transparente con un índice de refracción en este caso una célula para después ser reflejada y retornar, por lo que la altura se encuentra a partir de la siguiente ecuación [23]:

$$h(x, y) = \frac{\lambda \varphi(x, y)}{4\pi(n_{cell} - n_o)}, \quad (57)$$

donde n_o es el índice de refracción de aire y n_{cell} es el índice de refracción de la célula, como es difícil saber el índice de refracción en cada punto de la célula se considera como aproximación un valor promedio al índice de refracción del agua $n_{cell} \approx n_{agua} = 1.33$ [23]. En la gráfica de la Figura 5.32 se muestra la altura de la célula en estudio.

En la Figura 5.33 se muestra el modelo 3D o topografía celular de la mucosa de revestimiento en estudio.

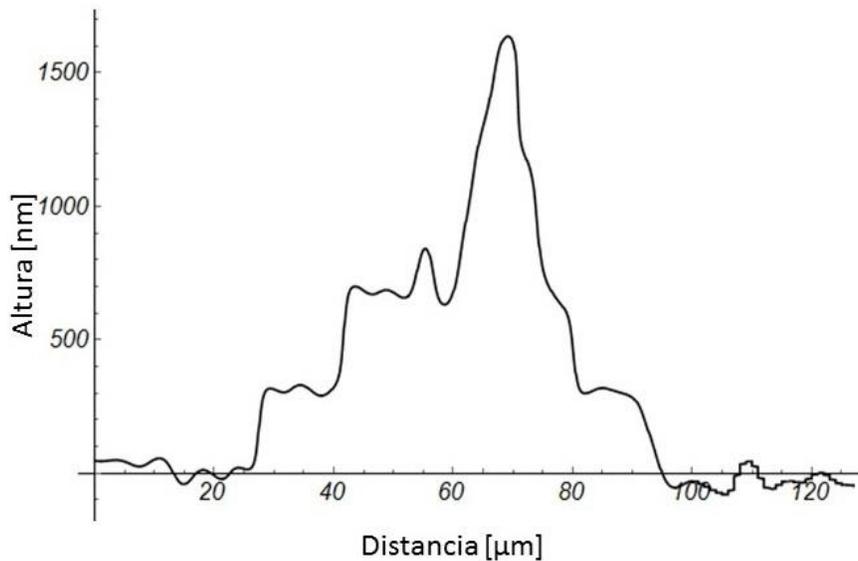


Figura 5.32. Perfil de la célula epitelial de la mucosa.

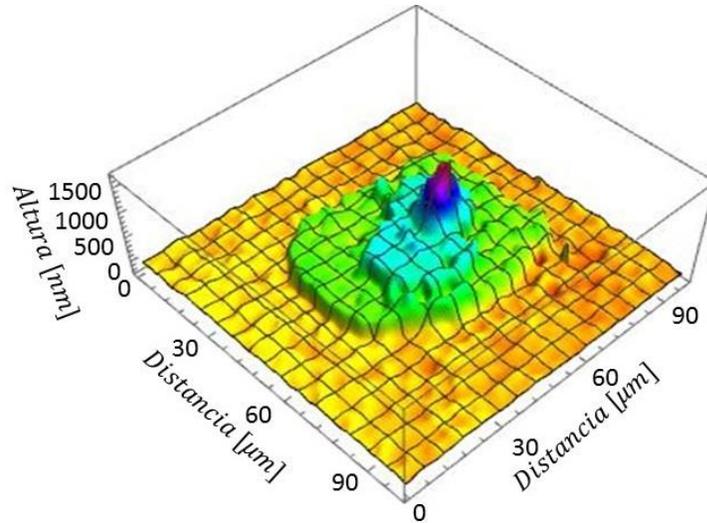


Figura 5.33. Modelo 3D de la célula epitelial de la mucosa.

5.7.5 Análisis de resultados y conclusiones

En la figura 5.29(f) en la reconstrucción de intensidad en se obtuvo una medición para obtener tamaño de la célula, cual tiene un valor de $66.1\mu\text{m}$. En la gráfica de la Figura 5.32 se muestra una aproximación de la altura célula donde la máxima elevación es poco más de 1600nm y además se puede considerar que la célula se conforma de tres niveles, donde el primero tiene una elevación de 300nm y el segundo una altura 700nm y el máximo 1600nm en la Figura 5.33 se muestra la topografía celular donde se aprecian estos niveles. Los resultados son consistentes con los tamaños reportados de las células.

El poder obtener la información de fase de manera cuantitativa vuelve a la MHD una herramienta muy eficaz, teniendo ventajas sobre otras técnicas de procesamiento de imágenes de contraste de fase, con el experimento realizado sobre una célula transparente se demuestra que este tipo de instrumento tiene amplio rango de aplicaciones y con posibilidades de aplicación en experimentos en tiempo real y gozando de ventajas de no contacto y no destructivos para analizar este tipo de muestras.

Capítulo 6

Conclusiones

La microscopía holográfica digital ofrece la posibilidad de desarrollo de aplicaciones en procesado de imágenes en distintas áreas de las ciencias naturales. En este trabajo se desarrolló un microscopio holográfico digital con el cual se desarrollaron una serie de experimentos para caracterización óptica, de espesor, volumen, e índice de refracción, en diversas muestras, inorgánicas y orgánicas, en las áreas de ciencia de materiales y biología.

La metodología de reconstrucción numérica por espectro angular que describe el fenómeno de la difracción de la luz utilizado, ofreció un modo efectivo de obtener el frente de onda del objeto a partir de un holograma digital. Esto se comprobó en la imagen del objeto a partir de su holograma digital respectivo. Esto es posible debido a que el holograma registra por completo el frente de onda, de manera que la imagen se puede obtener ajustando la posición del plano imagen, mediante la reconstrucción numérica del frente de onda.

Se aplicaron las bases teóricas de la holografía y difracción, a partir de los principios de la óptica de Fourier, puesto que la holografía ocurre en el espacio de las frecuencias espaciales. En la etapa de reconstrucción el frente de onda es necesario primero hacer el filtraje espacial para seleccionar las frecuencias espaciales óptimas, también tomar en cuenta la propagación del espectro angular y finalmente obtener el frente de onda del objeto mediante una transformada inversa de Fourier. Se utilizó una tarjeta de resolución USAF 1951 para la

comprobar la técnica de reconstrucción propuesta aquí, además se utilizó para comprobar la resolución espacial del microscopio.

Se realizaron distintos experimentos con el propósito de comprender el funcionamiento del microscopio holográfico digital en distintas muestras, ya sea opacas y transparentes, para realizar un análisis de los resultados y obtener conclusiones de estos. Se concluyó que en el caso de que las muestras sean opacas y reflejantes, el método desarrollado en esta tesis es más eficiente para caracterizar de manera óptima la topografía. Cuando la muestra es semi-transparentes se requiere considerar el índice de refracción complejo para tomar en cuenta la transmitancia, la reflectancia y la absorción, posibles del material. En caso particular de una muestra con una estructura multi-capas de distintos materiales, el método holográfico propuesto no arroja resultados de topografía correcta. Se cree que es debido a las reflexiones múltiples en las interfaces de las capas, que no fueron consideradas el método que se propone.

Los experimentos realizados con muestras opacas con aplicación en el área de dispositivos solidos como la antena dipolo o la estructura Ni/Si, el método holográfico de reconstrucción de frente de onda propuesto arroja buenos resultados que se comparan con los obtenidos, por contacto, con un perfilómetro. A diferencia del perfilómetro, el método holográfico explora de un golpe toda una región microscópica de la superficie de la muestra. Para este tipo de muestras opacas se puede realizar un análisis de perfil, rugosidad y defectos, en el orden de micras, con el método desarrollado.

Para el estudio de la topografía de la estructura semiconductor GaP, que consiste de un arreglo de multi-capas, el método holográfico propuesto no es apropiado, por lo que se requiere utilizar otra metodología, que en bibliografía se le conoce como reflectometría holográfica digital.

Los experimentos realizados con enfoque en biología las muestras fueron la epidermis de la cebolla y la célula epitelial de la mucosa. Con los datos de intensidad y fase de la reconstrucción de los hologramas digitales se obtuvieron los datos de la topografía a partir de fase desenvuelta. Los resultados son los esperados, si los comparamos con las dimensiones conocidas en la literatura.

Además de estos, se intentaron obtener hologramas digitales de las muestras citadas en la Tabla 5.1. Para el caso de las superficies solidas como de pistas de circuitos integrados, monedas, LP (disco de vinilo) estas eran superficies ásperas lo que ocasionaba que la reconstrucción de intensidad y fase se observara la superficie moteada o granulada lo cual impedía obtener datos concretos de fase. También se estudió las cualidades espaciales de un conducto micro-fluido para el área de biomédica. Los datos de profundidad del canal no fueron los esperados debido a que el arreglo experimental utilizado en modo de reflexión no era el adecuado. Para estos casos existen método más apropiados que están en desarrollo en la literatura, por ejemplo, un arreglo experimental Mach-Zehnder para transmitancia.

Como trabajo a futuro se propone mejorar el arreglo experimental para la reducción de ruido óptico y mejorar los hologramas digitales. Una manera es manejar solo luz polarizada con la introducción de un divisor de haz polarizado, retardadores y un objetivo de inmersión en aceite para aumentar la resolución. Se propone además comenzar los experimentos en tiempo real para obtener datos de la deformación de los dispositivos debido a cambios físicos/químicos externos/internos y obtener topografía dinámica o 4D.

Con el presente trabajo se mostró las capacidades de la MHD para estudiar las propiedades dinámicas espaciales de nanodispositivos, para para tecnologías en materiales inorgánicos/orgánicos.

Apéndice A

A.1 Reconstrucción numérica de hologramas digitales por espectro angular en el espacio objeto

En el capítulo 3 se muestra el proceso de reconstrucción numérica por espectro angular en el espacio imagen, en este apartado se colocó la reconstrucción numérica en el espacio objeto. Sigue la misma metodología de reconstrucción, pero ahora en el otro sistema coordenado (x', y') y (k'_x, k'_y) .

El espectro angular es la transformada de Fourier del campo de entrada $U_2(x', y', 0)$:

$$A_0(k'_x, k'_y, 0) = FFT \left\{ U_H(x', y', 0) e^{\frac{-ik((x'-s')^2+(y'-l')^2)}{2r''}} e^{i(dk'_x(x'-s')+dk'_y(y'-l'))} \right\}, \quad (A.1)$$

donde el operador $FFT\{\}$ es la transformada rápida de Fourier o en ingles Fast Fourier Transform. El término $e^{i(dk'_x(x'-s')+dk'_y(y'-l'))}$ es un prisma para mover el campo de entrada $U_2(x', y', 0)$ con el propósito de centrar las frecuencias espaciales del término +1 en el centro de las frecuencias espaciales.

En la ecuación A.1 las variables espaciales (para el espacio objeto vea la Figura 3.06) (x', y') cuyo valor discretizado es $x' = m\Delta x'$, $y' = n\Delta y'$ de manera que:

$$m = 0,1,2 \dots M - 1, \quad (A.2)$$

$$n = 0,1,2 \dots N - 1, \quad (A.3)$$

donde M y N son el total de columnas y filas de la matriz.

Similarmente discretizado la frecuencia espacial k'_x con $\Delta k'_x = \frac{2\pi}{M\Delta x'}$ y semejantemente k'_y con $\Delta k'_y$.

Las constantes $s' = \frac{M\Delta x'}{2}$ y $l' = \frac{N\Delta y'}{2}$ son para centrar la lente en la matriz y evitar que solo se muestre un cuarto de la lente y de igualmente el prisma descrito.

Para filtrar las frecuencias espaciales del término +1 primero se debe mover el campo de tal manera que las frecuencias +1 quede en el centro de las frecuencias espaciales dándole valores a $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y}$ [pixeles] en el prisma de la ecuación 38. Para filtrar el término +1 se utiliza un filtro pasa bajo circular donde k_r es la frecuencia de corte circular de manera:

$$A_{01}(k'_x, k'_y, 0) = \begin{cases} A_0(k'_x, k'_y, 0) & \text{si } \sqrt{k'^2_x + k'^2_y} < k_r, \\ 0 & \text{si no.} \end{cases} \quad (\text{A.4})$$

A partir de aquí continua en la ecuación 43 (Capitulo 3) donde se muestra la reconstrucción numérica del frente de onda en el espacio objeto y la relación de este con el espacio imagen.

A.2 Obtención de valores del prisma $\frac{dk_x}{\Delta k_x}$ y $\frac{dk_y}{\Delta k_y}$

Para obtener los valores del prisma para centrar las frecuencias espaciales del el término +1 en el centro de las frecuencias espaciales es necesario encontrar los valores correctos de $\frac{dk_x}{\Delta k_x}$

y $\frac{dk_y}{\Delta k_y}$ para en el caso de la ecuación 38 en sistema coordenado del espacio imagen o $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x}$ y

$\frac{dk'_y}{\Delta k'_y}$ para el sistema coordenado del espacio objeto vea ecuación A.1.

Para encontrar estos valores se usa en el programa desarrollado usando el visor para observar el espectro angular del holograma digital en LabView, donde por medio de un cursor

podemos encontrar la posición del término 0 de difracción cual siempre es el centro de la matriz en las coordenadas en pixeles [1280,960], si se coloca el cursor en el término +1 tenemos una posición de este en pixeles. Con estos valores se puede encontrar la distancia en que hay en *pixeles* del término +1 con respecto al término 0 de difracción en el espectro angular. En la Figura A.1. se muestra el espectro angular de un holograma y las distancias en pixeles en frecuencias espaciales del término +1 con respecto al término 0 de difracción.

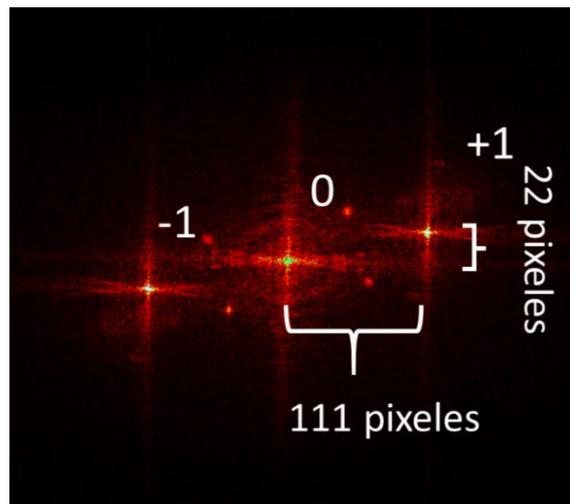


Figura A.1. Espectro angular de un holograma digital donde se muestran las distancias en frecuencias espaciales de término +1 con respecto al centro de las frecuencias espaciales.

Para el caso del espectro angular de la Figura A.1 las frecuencias del término +1 se centra en el centro de las frecuencias espaciales o en la posición [1280,960] de la matriz con valores

de $\frac{dk'_x}{\Delta k'_x} = -111 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk'_y}{\Delta k'_y} = 22 \text{ pixeles}$ para la reconstrucción en el espacio objeto.

A.3 Epidermis de la cebolla: proceso de reconstrucción del holograma digital con $\lambda = 612nm$

El holograma digital de la epidermis de la cebolla se muestra en la Figura A.2(a), un zoom donde se muestra las franjas de interferencia se muestra en Figura A.2(b). El espectro angular se muestra en la Figura A.2(c) donde los términos de difracción se remarcan en un recuadro blanco, para en este caso las frecuencias espaciales se expanden debido a la topografía de la muestra.

La región de frecuencias +1 se centró en el centro de frecuencias espaciales con valores $\frac{dk_x'}{\Delta k_x'} = 116.5 \text{ pixeles}$ y $\frac{dk_y'}{\Delta k_y'} = -54.5 \text{ pixeles}$ y se implementó en LabView un filtro rectangular en lugar de un circular para evitar pérdida de información, los límites del filtro pasa bajos fueron $\frac{k_x'}{\Delta k_x'} [1224, 1326] \text{ pixeles}$ y $\frac{k_y'}{\Delta k_y'} [815, 1169] \text{ pixeles}$, con esto se filtró la región +1 vea Figura A.2(d).

La distancia de reconstrucción fue $z'_{33} = z'_{p'} = 45\mu m$ donde $N = 60$, $\Delta z' = 15\mu m$, $n = 33$. La reconstrucción de intensidad se muestra en la Figura A.2(e) y la reconstrucción en fase en la Figura A.2(f).

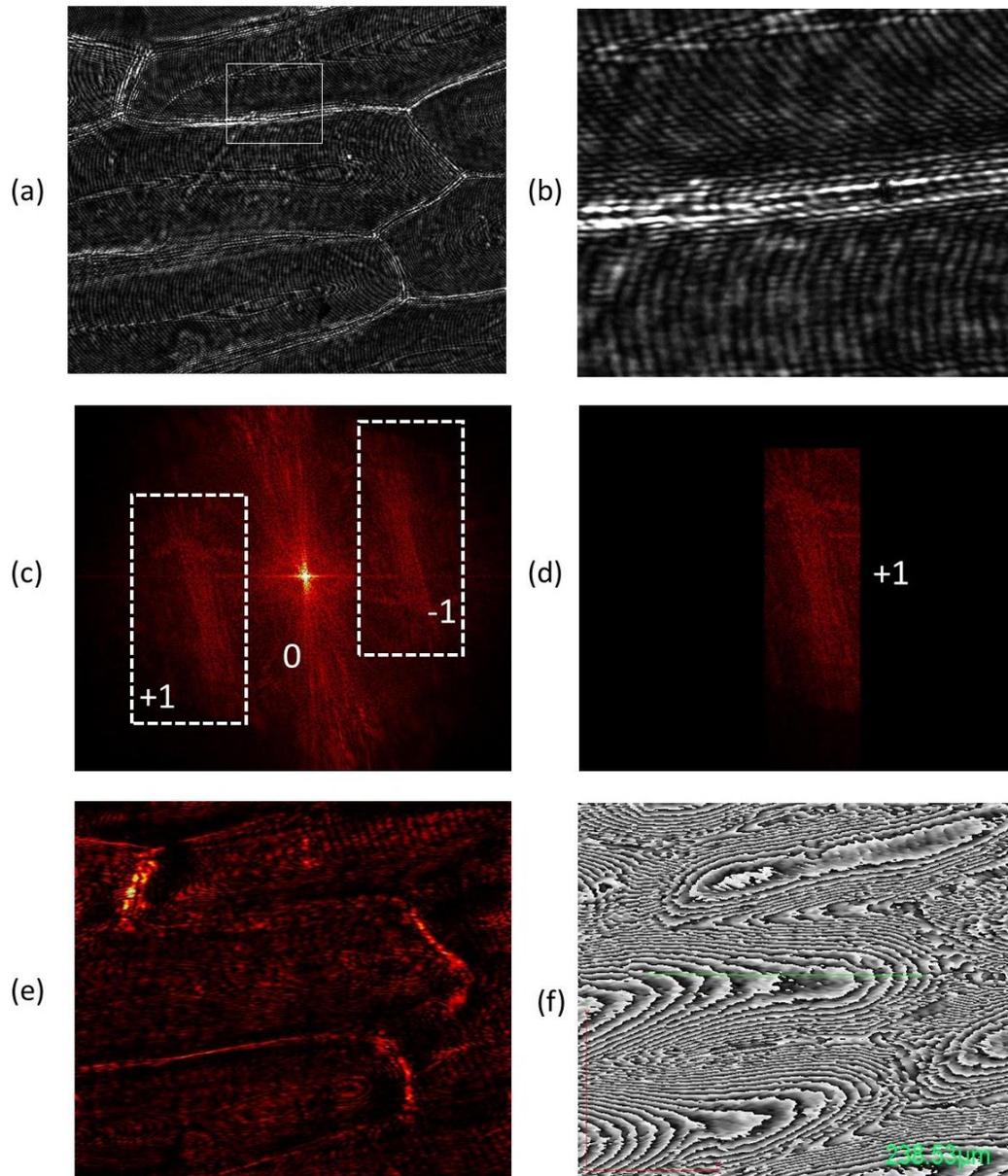


Figura A.2. Reconstrucción de un holograma digital de la epidermis de la cebolla.

(a) Holograma digital. (b) Zoom del recuadro blanco de (a). (c) Espectro angular del holograma marcando en recuadro blanco los términos de difracción +1 y -1. (d) Término +1 filtrado con un filtro rectangular pasa bajos. (e) Reconstrucción de intensidad donde se muestra varias células vegetales en orden. (f) Reconstrucción de fase, donde se presenta modulación 2π .

Apéndice B

B.1 Especificaciones técnicas de la tarjeta USAF

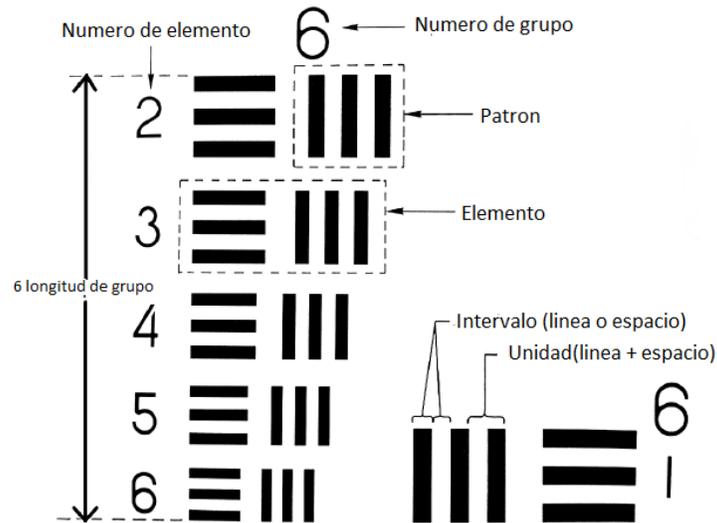


Figura B.1.Elementos de la tarjeta de resolución USAF.

Tabla B.1 Ancho de 1 línea en micrómetros en la tarjeta de resolución USAF 1951

[37].

Elemento	Numero de Grupo							
	0	1	2	3	4	5	6	7
1	500.00	250.00	125.00	62.50	31.25	15.63	7.81	3.91
2	445.45	222.72	111.36	55.68	27.84	13.92	6.96	3.48
3	396.85	198.43	99.21	49.61	24.80	12.40	6.20	3.10
4	353.55	176.78	88.39	44.19	22.10	11.05	5.52	2.76
5	314.98	157.49	78.75	39.37	19.69	9.84	4.92	2.46
6	280.62	140.31	70.15	35.08	17.54	8.77	4.38	2.19

B.2 Cámara CMOS IDS UI-1482LE

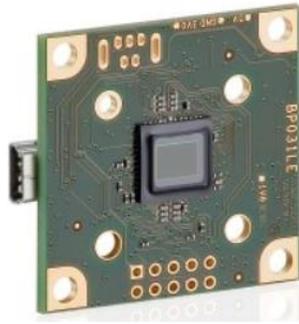


Figura B.2. Cámara CMOS IDS UI-1482LE [47]

Tabla B.2. Especificaciones técnicas de la cámara [47].

Fabricante	IDS
Modelo	UI-1482LE
Tipo	Progresivo Scan CMOS Mono
Área del sensor H x V (mm)	5.6 x 4,2
Píxeles H x V	2560 x 1920
Pixel Size H x V (μm)	2,2 x 2,2
La profundidad de color o bits por pixel	8-bit
Conexión	USB 2.0

B.3 Perfilómetro

En la Figura B.3 se muestra el perfilómetro en el laboratorio de dispositivos del IICO.



Figura B.3. Alpha-step 500 Surface profiler.

Especificaciones técnicas del perfilómetro [48]:

- Medición con aguja.
- Puede obtener el perfil de una variedad de materiales como discos magnéticos, obleas semiconductoras, cerámicos para micro-electronicos, vidrios para displays delgados, superficies ópticas, etc.
- Medición en vertical desde un rango de bajo 100\AA a aproximadamente 0.3mm con una resolución vertical 1 o 25\AA .
- Arriba de 5000 puntos por perfil que garantiza que la resolución horizontal está limitada por el radio de la punta.

Apéndice C

C.1 Figuras del programa desarrollado en LabView (Panel frontal y diagramas de bloques)

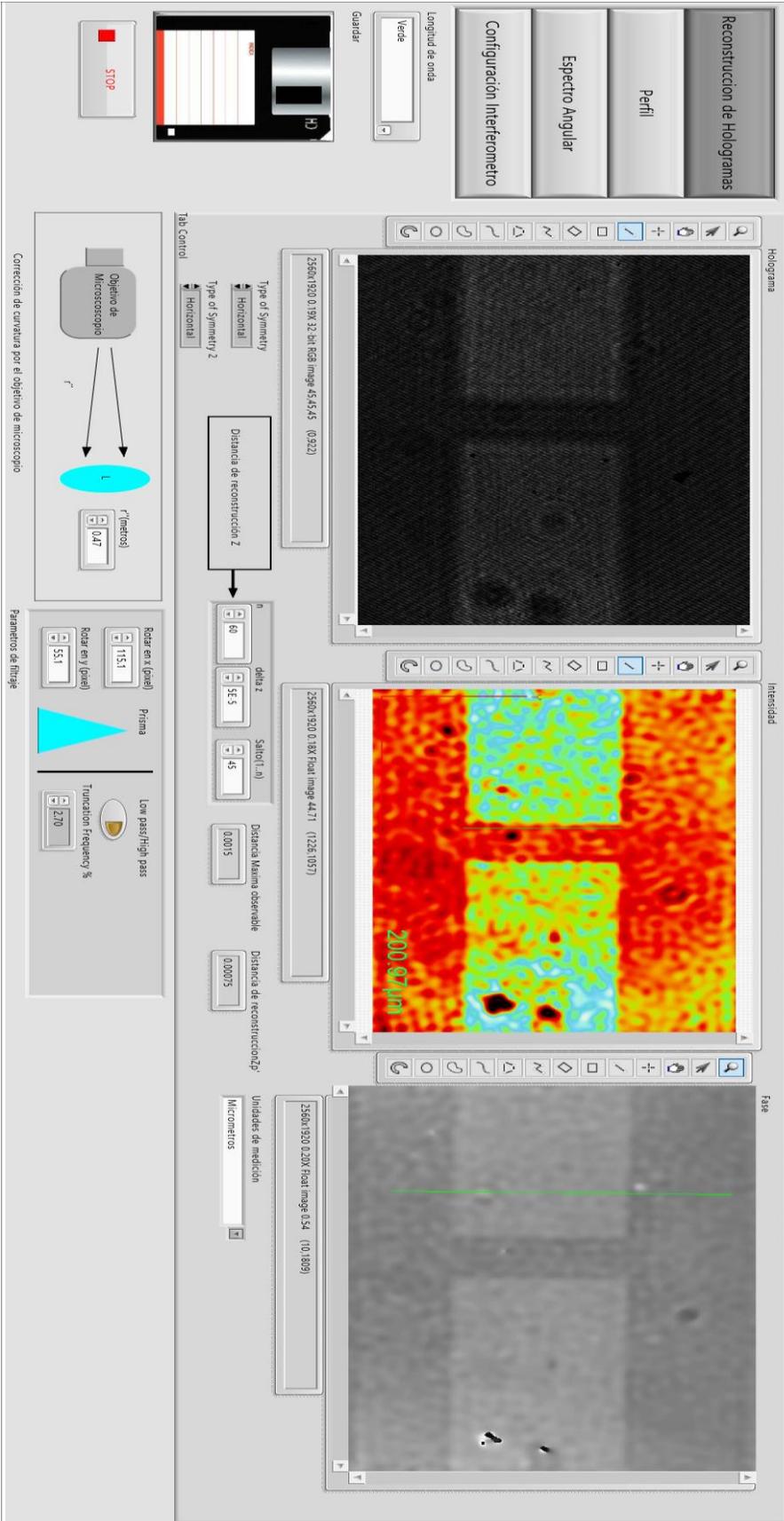


Figura C.1. Panel frontal, reconstrucción de hologramas.



Microscopio Holográfico Digital en LabView

Reconstrucción de hologramas digitales por el método espectro angular

AGUILERA RAMOS JOSE ANDRES



Reconstrucción de Hologramas

Perfil

Espectro Angular

Configuración Interferómetro

Longitud de onda

Verde

Guardar

Holograma 4

2560x1920 0.20V 32-bit RGB Image 22.22.22 (0.0)

Piano Fourier 2

2560x1920 3X Complex Image 10.00.0.00 (1.739.954)

Intensidad Filtrada

2560x1920 0.20V Pseud Image 22.60 (1.033.18172)

Objetivo de Microscopio

Conexión de curvatura por el objetivo de microscopio

Parámetros de filtraje

Rotar en X (gradi)

Rotar en Y (gradi)

Prisma

Low pass/High pass

Truncation Frequency %

r' (metros)

0.47

115.1

55.1

27.0

STOP

Figura C.2. Panel frontal, espectro angular.

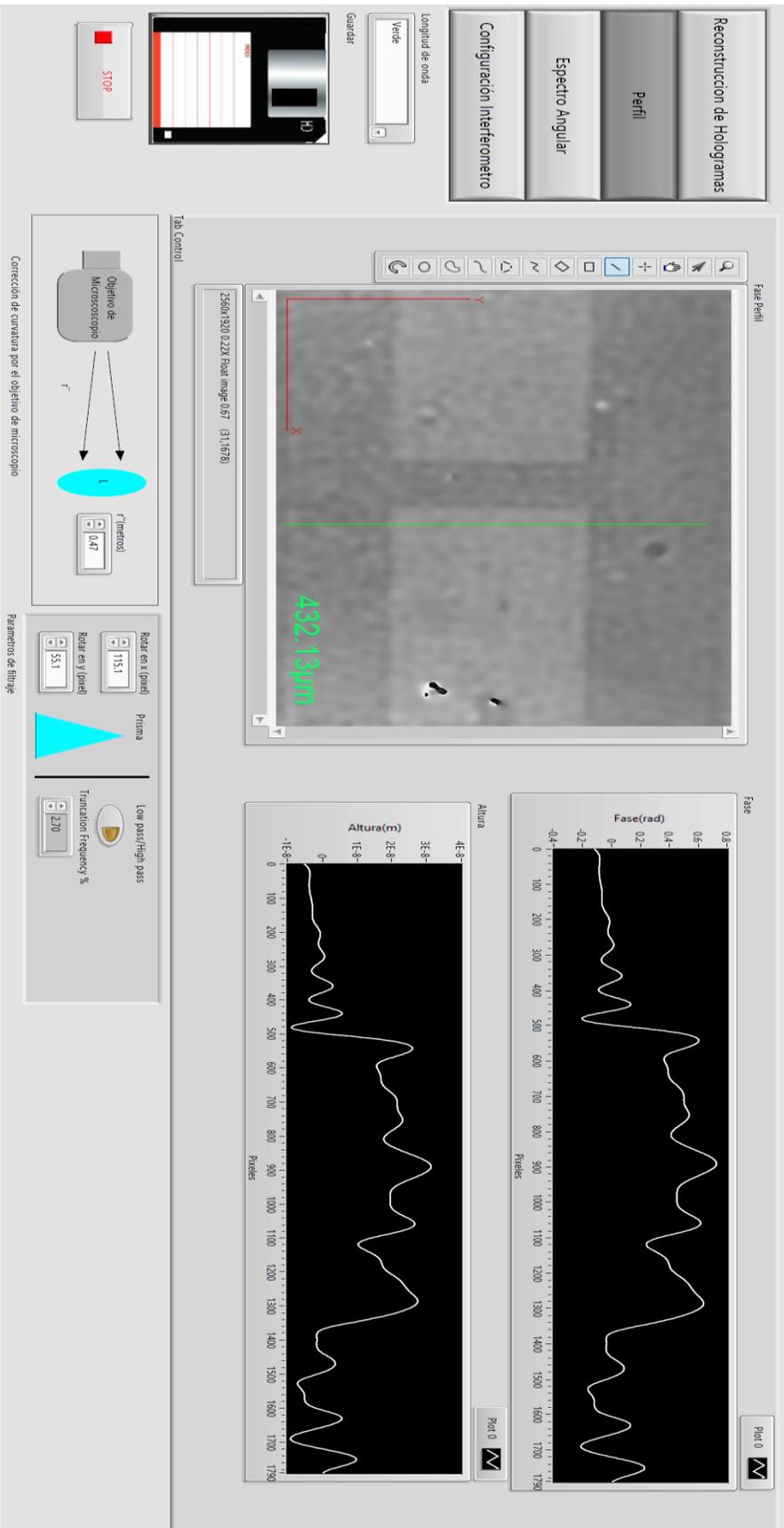


Figura C.3. Panel frontal, medición de perfil.



Microscopio Holográfico Digital en LabView

Reconstrucción de hologramas digitales por el método espectro angular

AGUILERA RAMOS JOSE ANDRES

TIEMPO REAL



Page 1 Page 3 Page 4 Page 2

Reconstrucción de Hologramas

Perfil

Espectro Angular

Configuración Interferómetro

Longitud de onda

Rojo

Guardar

Apuntes Bamos
Pól. Acadés
Materia en
Ciencias Aplicadas

STOP

Page 1 Page 3 Page 4 Page 2

Parámetros de entrada

Camara:

Archo de pixel:

Trunc((p(x,y,z))
False((p(x,y,z'))

Datos opcionales:

Distancia del foco LV:

Distancia muestra a pupila do:

Distancia de la pupila de MO al CMOS:

Objeto de Microscopio:

Magnificación lateral:

Resolución de salida:

Magnificación con parámetros de entrada:

Magnificación:

Tab Control

Objeto de Microscopio

Objeto de Microscopio

r (metros):

Rotar en x (grados):

Rotar en y (grados):

Prisma

Low pass/high pass

Truncation frequency: %

Corrección de curvatura por el objetivo de microscopio

Parámetros de filtraje

Directorio holograma:

Directorio intensidad:

Directorio de Perfil:

Directorio de fase:

Directorio de datos:

Meztra

Antena:

Tipo de Laser:

Tipo de medición:

Diagrama

Figura C.4. Panel frontal, configuración.

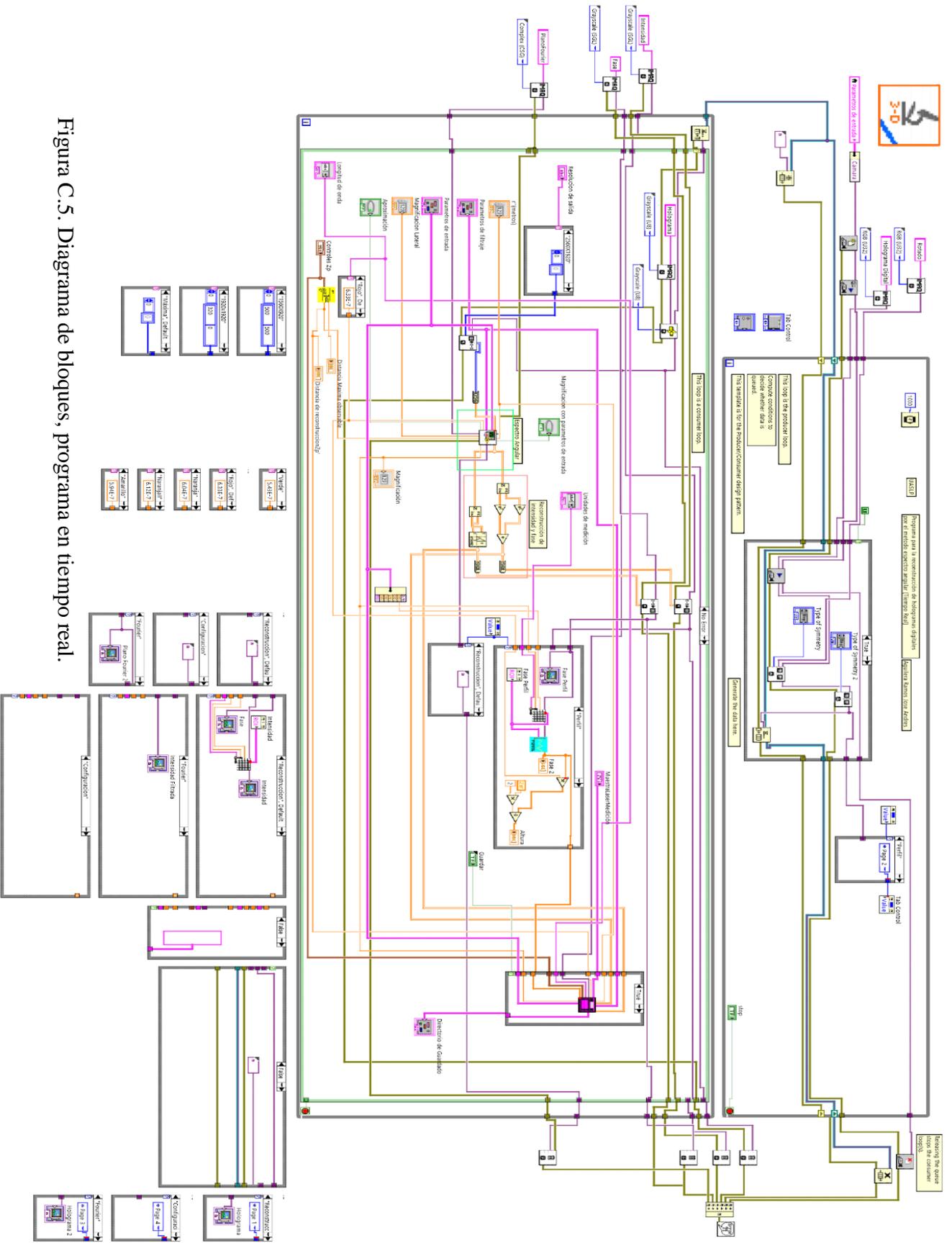


Figura C.5. Diagrama de bloques, programa en tiempo real.

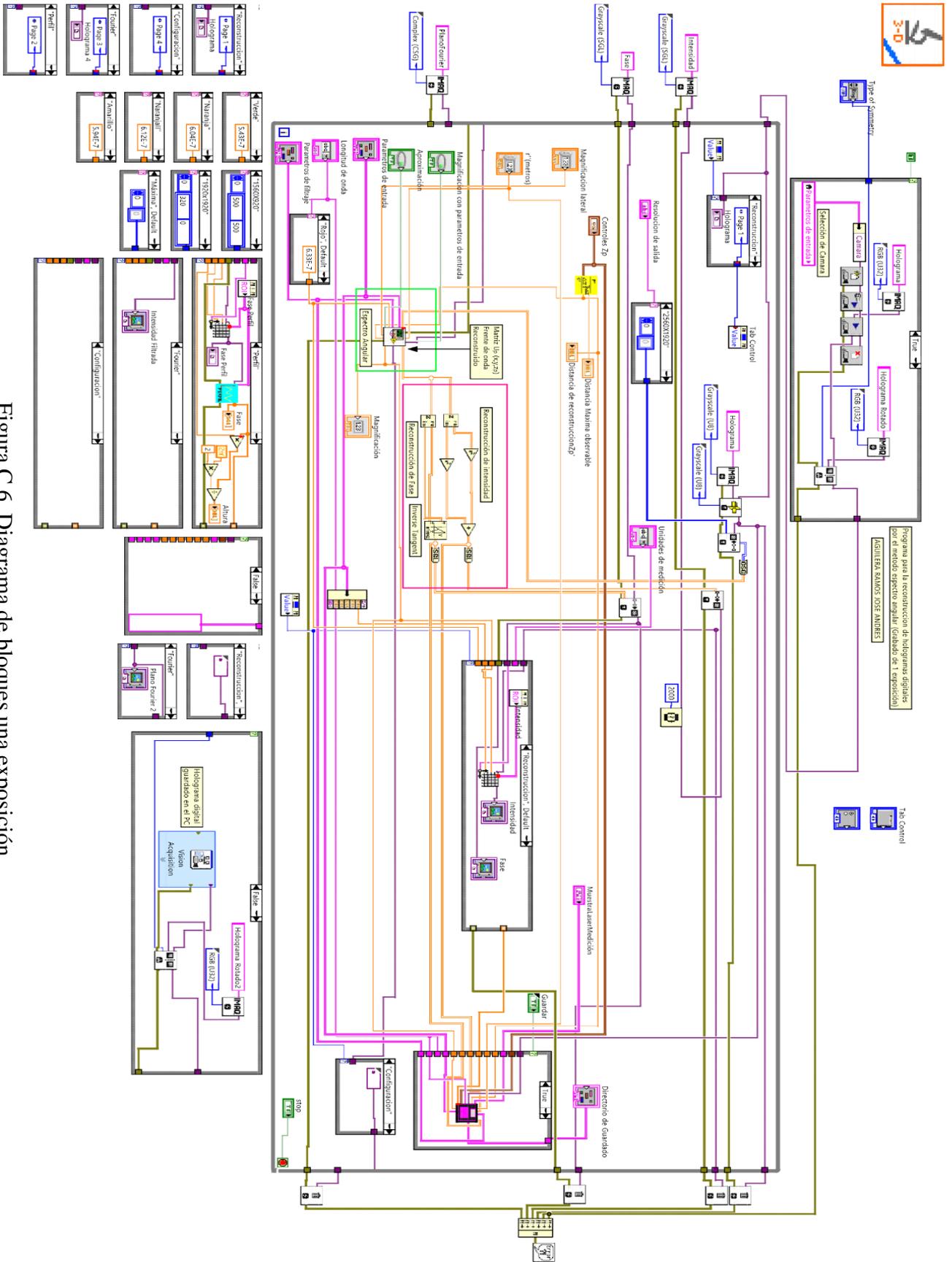


Figura C.6. Diagrama de bloques una exposición.

HologramaMascaraMO.vi

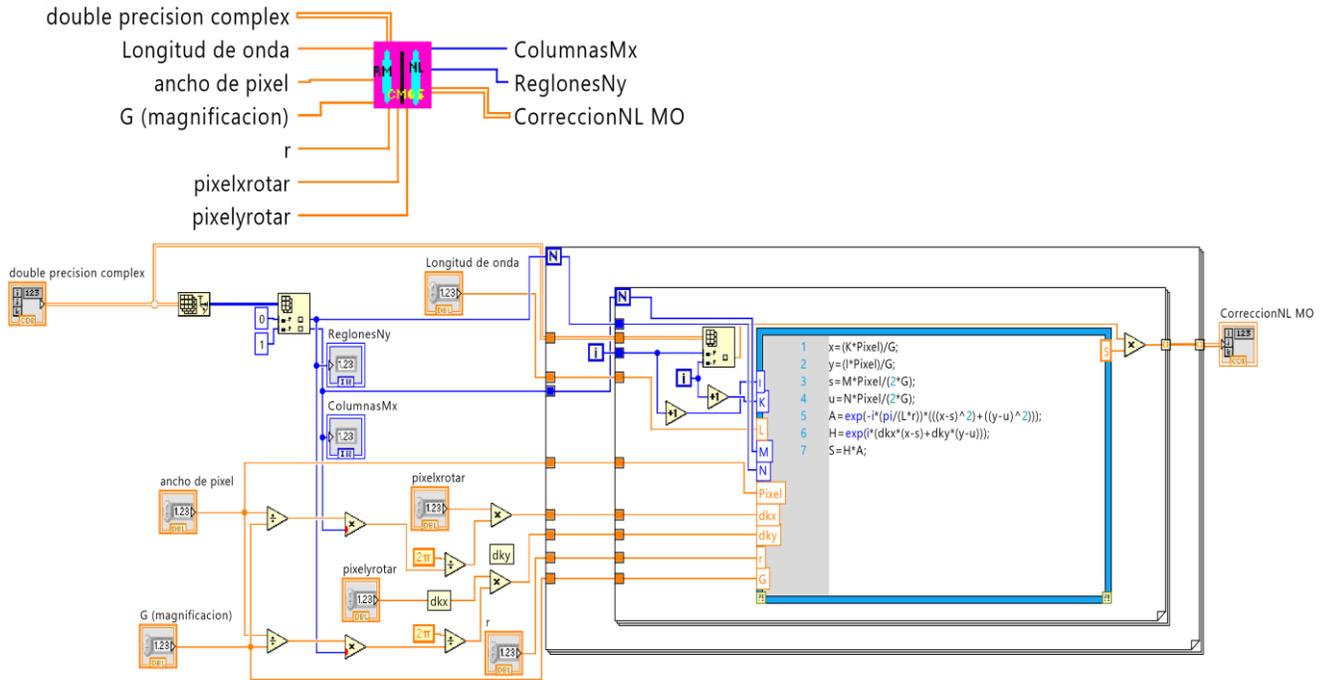


Figura C.8. Diagrama de bloques del subvi cual realiza la operación de la ecuación 38 o

A.1

FiltradoRectangular.vi

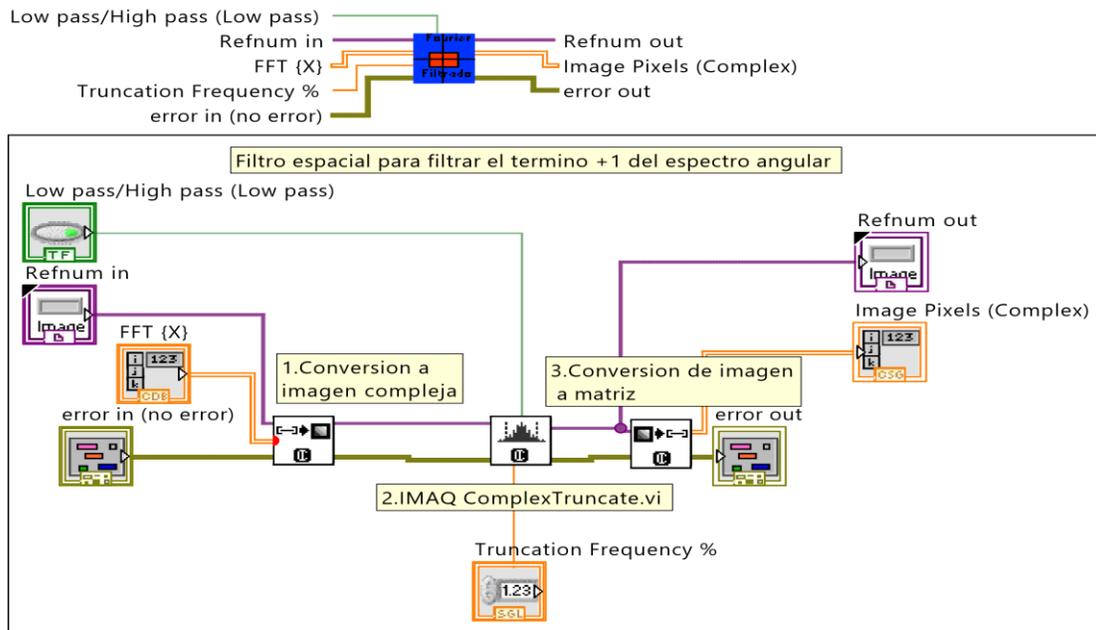


Figura C.9. Diagrama de bloques del subvi del filtro espacial.

expPropagacionZ.vi

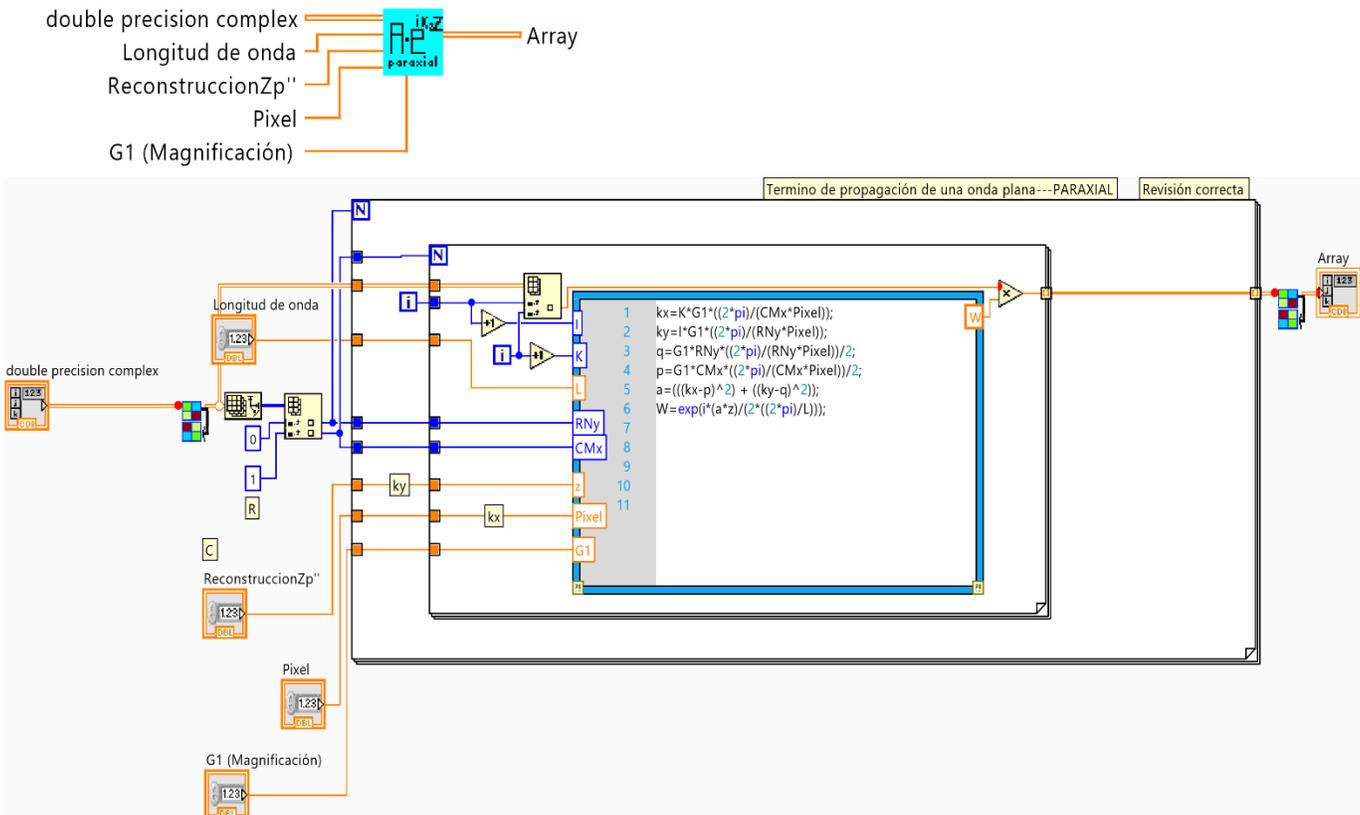


Figura C.10. Diagrama de bloque que realiza la operación de la ecuación 42 o 43.

expPropagacionZExacto.vi

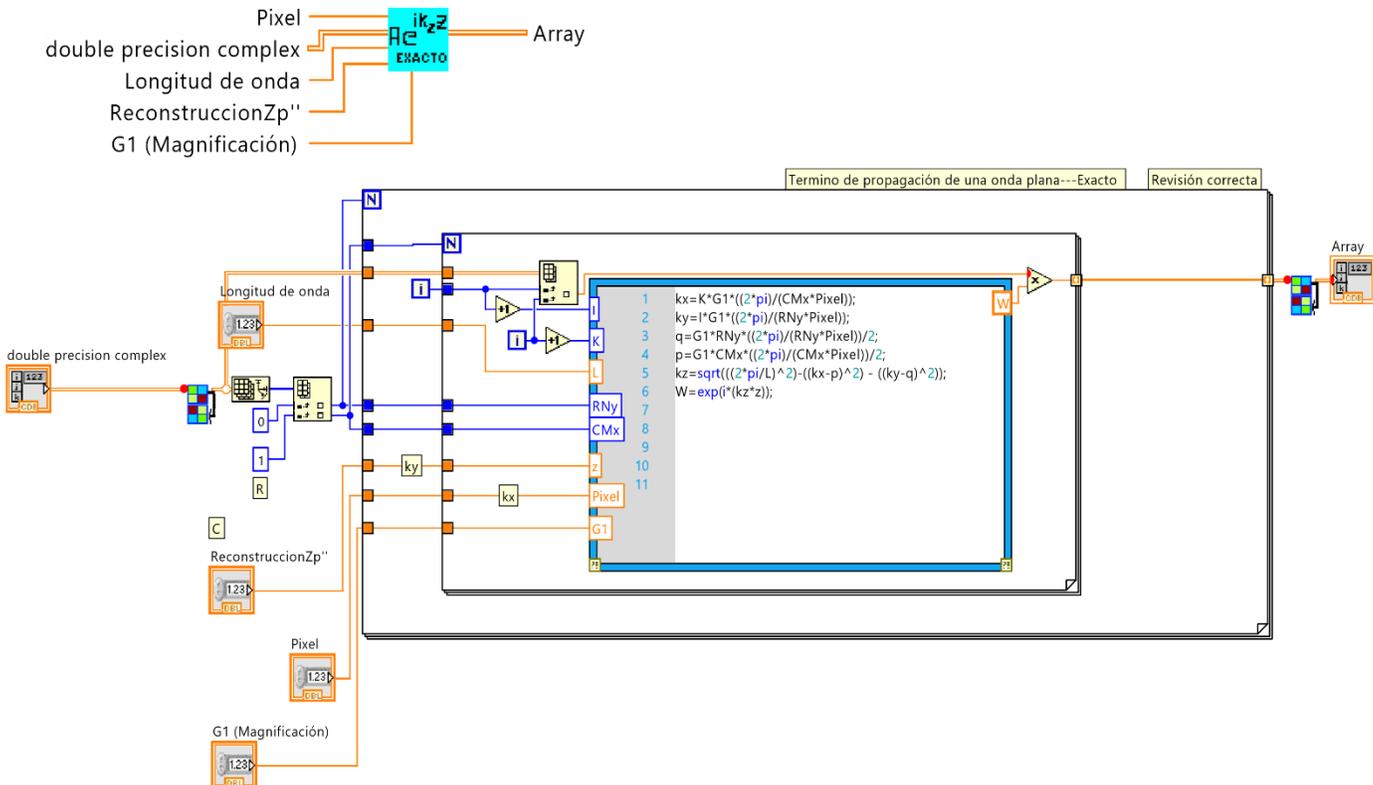


Figura C.11. Diagrama de bloque que realiza la operación de la ecuación 42 o 43.

Movercuadrantes.vi

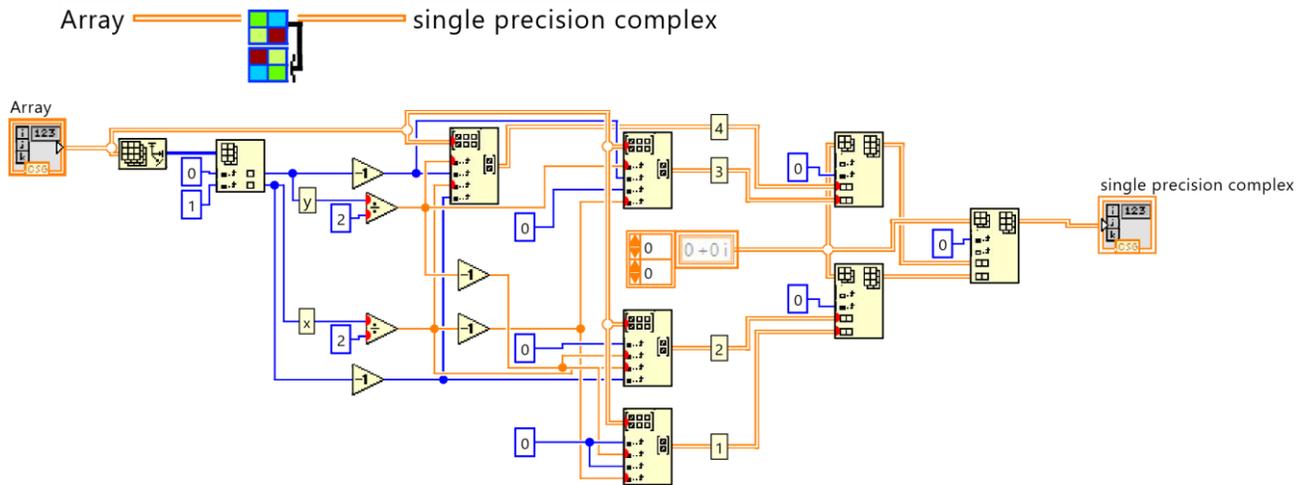


Figura C.12. Diagrama de bloques subvi que mueve los cuadrantes de una matriz.

ROIPerfil.vi

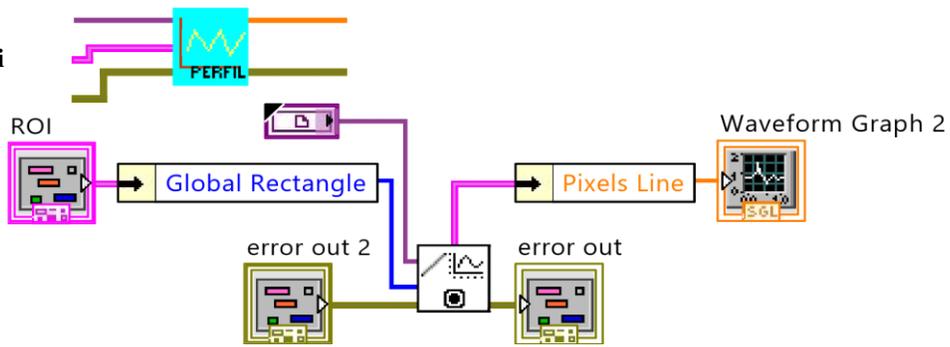


Figura C.13. Diagrama de bloques, subvi que extrae una línea de datos por medio del ROI.

calibracionyReconstrucciondeltaZ.vi

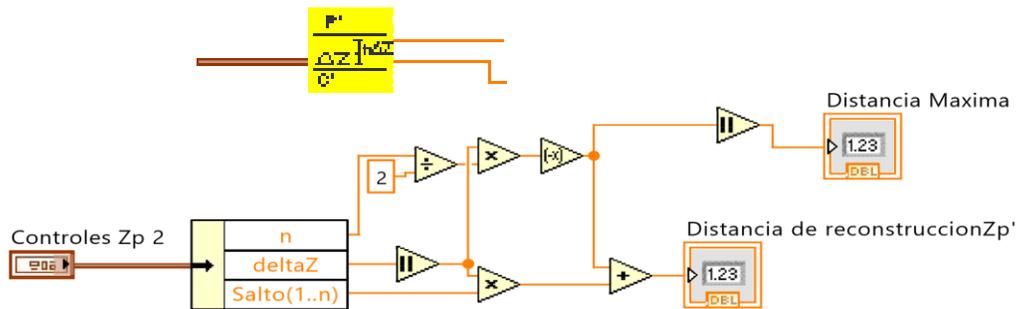


Figura C.14. Diagrama de bloques subvi que realiza la operación de la ecuación 54.

Guardado.vi

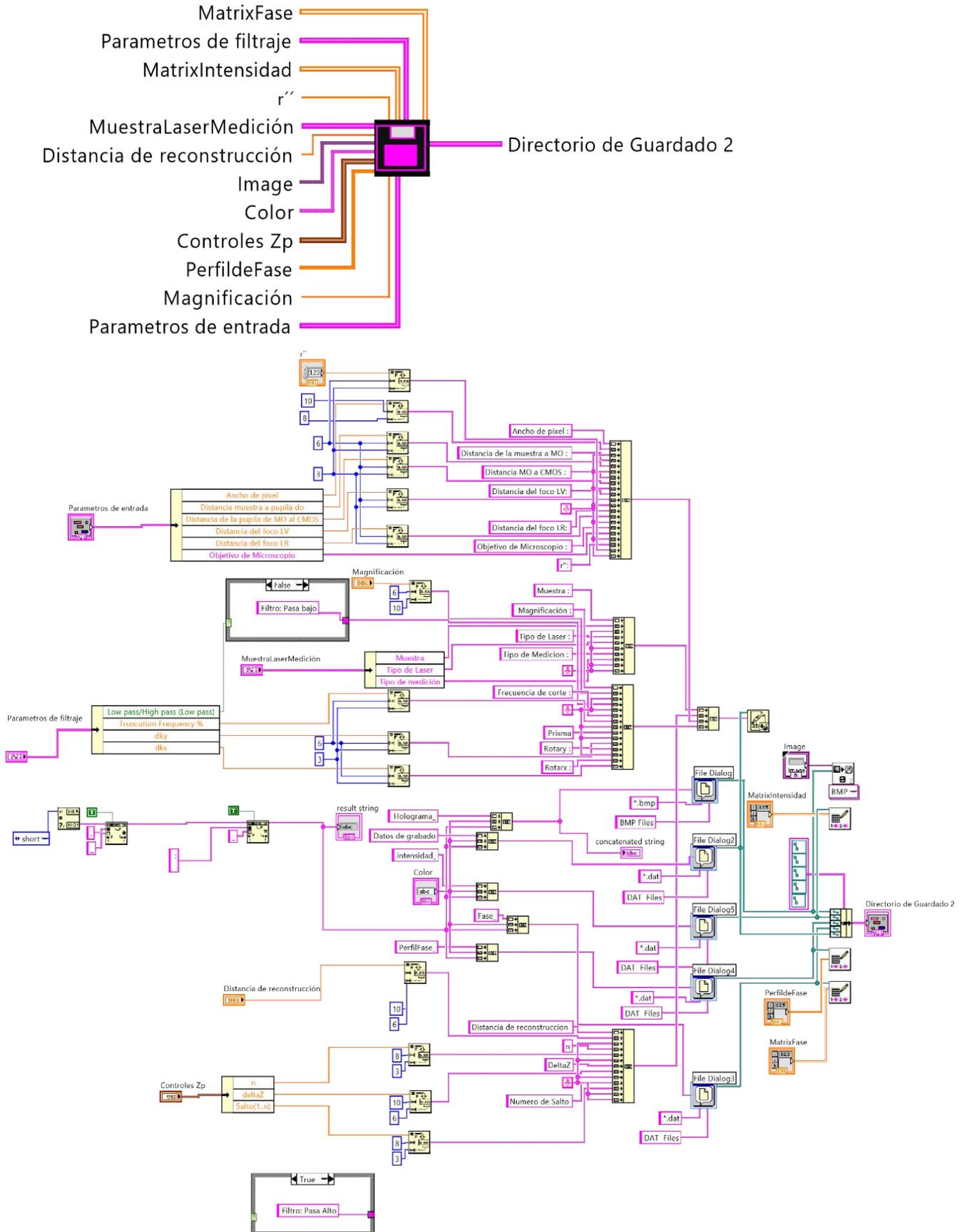


Figura C.16. Diagrama de bloques para el guardado de la información.

Referencias

- [1]. Dennis Gabor. *A new microscopic principle*, Nature 1948.Vol 161.
- [2]. Joseph W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*, Second Edition 1996, Stanford University, McGraw-Hill.
- [3]. Eugene Hecht. *Óptica*, Tercera Edición 2000, Addison Wesley Iberoamericana.
- [4]. W.Thomas Catheey. *Optical Information Procesing and Holography*, John Wiley & Sons 1974, University of Colorado, Denver, Colorado, USA.
- [5]. Ulf Schnars, Class Falldorf, John Watson, Werner Jüptner. *Digital Holography and Wavefront Sensing Principles, techniques and applications*, Second Edition 2015, Springer.
- [6]. Bahaa.E.A. Saleh, Malvin Cerl Teich. *Fundamentals of Photonics*, Second Edition 2007, WILEY.
- [7]. Max Born, Emeil Wolf. *Principles of optics Electronic theory of propagation interference and diffraction of light*, Seventh Edition 1999, Cambridge University Press.
- [8]. Myung K. Kim. *Digital Holography Microscopy: Principles, techniques and Applications*.2011. Springer Series in Optical Sciences.
- [9]. Okan K, Ersoy Wiley. *Diffraction, Fourier Optics and Imaging*, Wiley-Interscience a John Wiley & sons, Inc., publication. New Jersey 2007.

- [10]. Georges Nehmetallah, Partha P. Banerjee. *Applications of digital and analog holography in three-dimensional imaging*, OSA, Advances in Optics and Photonics Vol. 4, Issue 4, (2012).
- [11]. Shimobaba, T, Kakue, *Review of Fast Algorithms and Hardware Implementations on Computer Holography*, IEEE transactions on industrial informatics, Vol. 12(4), 1611 (2016).
- [12]. Kersti Alm, Helena Cirenajwis, Lennart Gisselsson, et. al., *Digital Holography and Cell Studies, Holography, Research and Technologies*, Prof. Joseph Rosen (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/15364, 2011.
- [13]. G. J. Lora, N. Múnera, J. García-Sucerquia. *Modelling And Reconstruction Of Digital In-Line Holograms For Assessing The Performance Of DIHM*, Revista Colombiana de Física, Vol. 43, No. 3 de 2011.
- [14]. Lingfeng Yu and Myung K. Kim. *Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method*, OSA, Optics Letters Vol. 30, Issue 16, 2005.
- [15]. Yuan Hong, Tielin Shi, Xiao Wang, Yichun Zhang, Kepeng Chen, Guanglan Liao. *Weighted adaptive spatial filtering in digital holographic microscopy*, Optics Communications, Volume 382, 2017.
- [16]. Thomas Kreis. *Handbook of Holographic Interferometry Optical and Digital Methods*, 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [17]. Ding Yu, Shang Wenbin, Yang Hong, and Yang Yan. *Measurements of the Characteristics of Transparent Material Using Digital Holography*, Hindawi Publishing

Corporation, *Advances in Materials Science and Engineering* Volume 2013, Article ID 598737.

[18]. Richard Leach, *Optical Measurement of Surface Topography*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

[19]. J. Herrera, E. Mendoza, C. García, R. Castañeda. *Application of transmission digital holographic microscopy for the characterization of thin films thickness*, *Scientia et Technica* Año XIII, No 36, Septiembre 2007.

[20]. V. Micó, C. Ferreira, Z. Zalevsky, J. García. *Basic principles and applications of digital holographic microscopy*, in *Microscopy: Science Technology, Applications and Education*, A. Méndez-Vilas and J. Díaz, eds. (Formatex Research Center, 2010), pp. 1411–1418.

[21]. Nicolas Verrier, Danier Alexandre, Gilles Tessier, and Michel Gross. *Holographic microscopy reconstruction in both object and image half spaces with undistorted 3D grid*, *Applied Optics*, OSA, 2015, 54 (15).

[22]. N. Verrier, D. Donnarumma G. Tessier and M. Gross. *High numerical aperture holographic microscopy reconstruction with extended z range*, *Applied Optics*, OSA, 2015, 54 (32).

[23]. Alexander Khmaladze, Myung Kim, and Chun-Min Lo. *Phase imaging of cells by simultaneous dualwavelength reflection digital holography*, July 2008, Vol. 16, No. 15, *Optics Express*.

[24]. Szabolcs Tókécs, László Orzó. *Afocal digital holographic microscopy and its advantages*, 2012 13th International Workshop on Cellular Nanoscale Networks and their Applications, Turin, 2012, pp. 1-5. doi: 10.1109/CNNA.2012.6331443.

- [25]. Warnasooriya, Nilanthi. *Quantitative phase imaging microscopy with multi-wavelength optical phase unwrapping*, 2000. Graduate Theses and Dissertations, University of South Florida.
- [26]. Daniel Parshall and Myung K. Kim Digital. *Holographic microscopy with dual-wavelength phase unwrapping*, OSA, Applied Optics Vol. 45, 2006.
- [27]. National Instruments Corporation, *LabView User Manual*, April 2003 Edition.
- [28]. National Instruments Corporation, *NI Vision for LabView User Manual*, November 2005.
- [29]. National Instruments Corporation, *IMAQ Vision Concepts Manual*, October 2000 Edition.
- [30]. Christopher G. Relf. *Image acquisition and processing with LabView*, CRC Press, 2003.
- [31]. Leica Microsystems Inc. , *La teoría del microscopio*, Educational and Analytical Division, Buffalo, New York USA, ISO-9001 Certified.
- [32]. Gerald Karp. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*, McGraw-Hill Interamericana editores, 2011.
- [33]. J.Simon Rodriguez, *Aplicación de microbolómetros acoplados a antenas en sistemas comunicación optima*, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2010.
- [34]. L. F. Lastras-Martínez, R. Herrera-Jasso, N. A. Ulloa-Castillo, R. E. Balderas-Navarro, A. Lastras-Martínez, et. al., *Optical characterization of orientation-patterned GaP structures by micro reflectance difference spectroscopy*, Journal of Applied Physics Vol.114, 173504 (2013).

- [35]. Thomas Jr.a, Martin A. Hunta, Tracy M. Bahma. *Direct To Digital Holography For High Aspect Ratio Inspection of Semiconductor Wafers*, AIP Conference Proceedings Vol.683, 254 (2003).
- [36]. Myung K. Kim. *Applications of digital Holography in biomedical microscopy*, Department of Physics, OSA, Journal of the Optical Society of Korea Vol. 14, Issue 2.2010.
- [37]. Applied Image Inc. *T-20 USAF 1951 Chart Standard Layout Product Specifications*, NY, USA.
- [38]. Ergun Simsek. *Effective Refractive Index Approximation and Surface Plasmon Resonance Modes of Metal Nanoparticle Chains and Arrays*, Piers online, Vol. 5, No. 7, 2009.
- [39]. M.I Pedraza Morales, G. Rodríguez Zurita, *Propiedades de difracción en campo lejano de rejillas intercalas de Ronchi*, Revista Mexicana de Física, Vol. 47, No 003 (2001).
- [40]. Tristan Colomb, Yves Emery. *Digital holographic reflectometry for semi-transparent multilayers topography measurement*, 2012 International Symposium on Optomechatronic Technologies (ISOT 2012), Paris, 2012, pp. 1-2.doi: 10.1109/ISOT.2012.6403297.
- [41]. Tristan Colomb, Stefan Krivec, Herbert Hutter, et. al., *Digital Holographic Reflectometry*, OSA, Optics Express Vol. 18, Issue 4, pp. 3719-3731 (2010).
- [42]. Francisco Javier Rodríguez Aranda, Tesis de Doctorado en Ciencias Aplicadas, UASLP, en proceso.

- [43]. Hongyue Sun, Michael A Player, John Watson, et. al., *The use of digital/electronic holography for biological applications*. IOP Publishing Ltd, Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, Vol.7, Number 6, 2005.
- [44]. Pearay L. Ogra, Warren Strober, Jiri Mestecky, Jerry R. McGhee, Michael E. Lamm, John Bienenstock. *Handbook of Mucosal immunology*, Academic Press, Inc.1 edition, 1994.
- [45]. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. *Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Medica Panamericana 5 edición, 2007.
- [46]. Richard M. Goldstein, Howard A. Zebker, Charles L. Werner. *Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping*, in *Radio Science*, vol. 23, no. 4, pp. 713-720, July-Aug. 1988.
- [47]. IDS Imaging Development Systems, *UI-1482LE-M, hoja técnica de la cámara CMOS*.
- [48]. Tencor instruments, *Alpha-step 500 surface profiler user manual*.