

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN OPTICA A.C.



TESIS DE MAESTRÍA

**ESTUDIO DE LA SUPERRESOLUCIÓN ÓPTICA EN
MICROSCOPIA HOLOGRÁFICA DE GABOR**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN OPTOMECATRÓNICA

por

Ing. DANIEL OMAR OLVERA CASTAÑEDA

Tesis dirigida por: Dr. Noé Alcalá Ochoa

LEON, MEXICO
2014

MAYO,

Agradecimientos

Doy mi agradecimiento al Centro de Investigaciones en Óptica así como toda la comunidad que participa dentro de esta institución y a quienes fueron mis profesores por haberme dado la oportunidad de formarme académicamente. En particular a mi Director de Tesis el Dr. Noé Alcalá Ochoa por haberme brindado los medios necesarios para hacer posible el presente trabajo, así como por su tiempo y sus enseñanzas.

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico recibido durante los 2 años cursados.

Agradezco a la M. en C. Cruz Yuliana Calderón Hermosillo por haber realizado previamente la caracterización del modulador espacial de luz utilizado en el presente trabajo.

Y finalmente agradezco a mis compañeros de generación y demás compañeros de la institución por su apoyo y compañía en todo momento y que lograron que mi estancia en la institución fuera más grata.

Resumen

La presente tesis tiene por objeto la aplicación de pupilas superresolutoras a la microscopía de campo lejano y sin escaneo. Las pupilas superresolutoras tienen origen en la teoría de Toraldo Di Francia basada en la super ganancia de antenas tipo end-fire y estas han sido aplicadas desde los años 1980's en microscopía confocal que es una técnica de microscopía de escaneo.

El camino para llevar a cabo el presente estudio fue la utilización de las pupilas superresolutoras de fase y complejas obtenidas por los métodos de Cagigal et. al., con las cuales se puede obtener reducción de hasta 0.65 del disco de Airy, aplicadas en la microscopía holográfica de Gabor (DIHM) mediante un modulador espacial de luz. Los experimentos realizados mostraron que las pupilas superresolutoras distorsionan los hologramas adquiridos por la técnica de DIHM e impiden la reconstrucción de este. Dado lo anterior se propuso una pupila superresolutora de solo amplitud que no distorsiona los hologramas y mejora directamente la función de transferencia del sistema obteniendo de esta manera imágenes de DIHM con superresolución. Sin embargo la técnica propuesta en el presente trabajo no supera la frecuencia de corte, si no solamente mejora la función de transferencia del sistema.

Se espera que para esta técnica por su naturaleza sea de utilidad también en otros métodos holográficos tales como Holografía fuera de eje, Holografía de Fourier etc.

Índice de Figuras

FIGURA 1-1. PERFIL DE INTENSIDAD DE UN PUNTO FOCAL (ECU. (1)).....	1
FIGURA 1-2. CRITERIO DE RAYLEIGH	2
FIGURA 1-3. COMPARACIÓN ENTRE EL CRITERIO DE RAYLEIGH, SPARROW Y DOS FUENTES PUNTUALES NO RESUELTAS.	3
FIGURA 1-4. ESQUEMATIZACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA DIFRACCIÓN EN UN SISTEMA DE FORMACIÓN DE IMÁGENES DE UNA LENTE PARA DESCRIBIR EL CRITERIO DE ABBE.	4
FIGURA 1-5. ESQUEMATIZACIÓN DEL EFECTO DE LA RESOLUCIÓN ÓPTICA. SIN PUPILA SUPERRESOLUTORA (IZQUIERDA), CON PUPILA SUPERRESOLUTORA (DERECHA). 1. OBJETIVO DE MICROSCOPIO, 2. REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DEL PUNTO FOCAL, 3 PROPAGACIÓN DEL PUNTO FOCAL, 4 REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DEL PUNTO FOCAL CON SUPERRESOLUCIÓN, 5. PROPAGACIÓN DEL PUNTO FOCAL MÁS PEQUEÑO QUE EL DE LA IZQUIERDA.	5
FIGURA 1-6. ARREGLO EXPERIMENTAL PROPUESTO. P-POLARIZADOR LINEAL, FE- FILTRO ESPACIAL, L- LENTE COLIMADORA, OM-OBJETIVO DE MICROSCOPIO, M-MUESTRA.....	6
FIGURA 2-1. A) ARREGLO ÓPTICO PARA REALIZAR HOLOGRAFÍA, B) ARREGLO ÓPTICO PARA RECONSTRUCCIÓN DEL HOLOGRAMA. 1-LÁSER, 2-FILTRO ESPACIAL, 3-LENTE, 4-DIVISOR DE HAZ, 5-OBJETO, 6-ESPEJO, 7-HOLOGRAMA, 8-PANTALLA OPACA.....	9
FIGURA 2-2. ARREGLO ÓPTICO DE MICROSCOPIO HOLOGRÁFICO. 1-LÁSER, 2-MUESTRA, 3-MICROSCOPIO, 4-HOLOGRAMA.....	13
FIGURA 2-3. ARREGLO ÓPTICO DE MICROSCOPIO HOLOGRÁFICO DE GABOR. 1-LÁSER, 2-PINHOLE, 3-MUESTRA, 4-HOLOGRAMA. LAS LÍNEAS PUNTEADAS REPRESENTAN EL FRENTE DE ONDA ESPARCIDO (POR LA MUESTRA) Y LAS LÍNEAS SOLIDAS EL FRENTE DE ONDA DE REFERENCIA.	14
FIGURA 3-1. EJEMPLO DE ABERTURA SINTÉTICA.....	17
FIGURA 3-2. ARREGLO DE SUPERRESOLUCIÓN MEDIANTE ABERTURA SINTÉTICA CON UNA REJILLA PERIÓDICA HEXAGONAL DE FASE. E-ESPEJO, DH-DIVISOR DE HAZ, F-FILTRO ESPACIAL, $\lambda/2$ -PLACA DE MEDIA ONDA, M-MUESTRA, L-LENTE COLIMADORA.	18
FIGURA 3-3. REJILLA HEXAGONAL. LAS LÍNEAS PUNTEADAS REPRESENTAN LOS RAYOS QUE SE DESVIARÍAN HACIA FUERA DEL SENSOR SI LA REJILLA NO ESTUVIERA ELÉCTRICAMENTE POLARIZADA Y LAS LÍNEAS SOLIDAS REPRESENTAN LOS RAYOS CAPTURADOS POR EL SENSOR CUANDO ES APLICADO UN VOLTAJE A LA REJILLA.....	19
FIGURA 3-4. PHASE SHIFTING DIHM.	19
FIGURA 3-5. SUPERRESOLUCIÓN EN MICROSCOPIA CONFOCAL.....	20
FIGURA 3-6. ESTRUCTURA DE UN CRISTAL LÍQUIDO SOBRE SILICIO (LCOS).....	21
FIGURA 3-7. CONCEPTO DE PSF (POINT SPREAD FUNCTION).....	23
FIGURA 3-8. PUPILA ANULAR $0 < (h=(r/R)) < 1$	25
FIGURA 3-9. MTF DE PUPILAS ANULARES VARIANDO LA RELACIÓN $h=r/R$	26
FIGURA 3-10. GRÁFICA POLAR DEL PATRÓN DE RADICACIÓN DE UNA ANTENA DE 5 ELEMENTOS.	27
FIGURA 3-11. GRÁFICA DEL PATRÓN DE RADICACIÓN DE UNA ANTENA DE 5 ELEMENTOS.	28
FIGURA 3-12. RANGO DE Z PARA $L = \lambda/4$	28
FIGURA 3-13. A) CEROS EN EL CIRCULO UNITARIO DE UNA ANTENA CON 3 ELEMENTOS Y ESPACIADO ENTRE ELEMENTOS DE $L = \lambda/4$, B) CEROS EQUIESPACIADOS DENTRO DEL RANGO DE Z.	29
FIGURA 3-14. COMPARACIÓN ENTRE LA RADIACIÓN DE UNA ANTENA CON SUS CEROS EQUIESPACIADOS (ROJA) Y UNA CON SUS CEROS EQUIESPACIADOS EN EL RANGO DE Z.	29
FIGURA 3-15. PSF DE UNA PUPILA LIBRE (A) Y PSF DE UNA PUPILA ANULAR (B).....	30
FIGURA 3-16. COMPARACIÓN ENTRE UNA PUPILA LIBRE Y LAS PUPILAS SUPERRESOLUTORAS DE UN ANILLO Y MÚLTIPLES ANILLOS. A) PUPILA LIBRE, B) PUPILA ANULAR DE TAMAÑO D, C) PUPILA DE TORALDO DI FRANCIA CON ANILLOS DE TAMAÑO D, $2D/3$ Y $D/3$	31

FIGURA 3-17. VÓRTICE CON M=1 (IZQUIERDA) Y M=2 (DERECHA).....	32
FIGURA 3-18. VISTA LATERAL DE UNALENTE (IZQUIERDA) Y UN AXICON CÓNICO (DERECHA).....	33
FIGURA 3-19. TRAZO DE RAYOS DE UN AXICON DIVIDIDO EN UN CONJUNTO DE ANILLOS.	33
FIGURA 3-20. EL PRIMER EXPERIMENTO EN DEMOSTRAR HACES ADIFRACCIONALES.	34
FIGURA 3-21. NOTACIÓN PARA EL CÁLCULO DE LA IMAGEN EN EL PLANO ($\Xi, H ; Z$) FORMADA POR UN AXICON EN REFLEXIÓN.....	35
FIGURA 4-1. ARREGLO EXPERIMENTAL PARA PROBAR LA SUPERRESOLUCIÓN EN DIHM. P-POLARIZADOR LINEAL, FE- FILTRO ESPACIAL, L-LENTE COLIMADORA, DH-DIVISOR DE HAZ, OM-OBJETIVO DE MICROSCOPIO, M-MUESTRA.	36
FIGURA 4-2. ARREGLO UTILIZADO PARA COMPROBAR LA REDUCCIÓN DEL DISCO CENTRAL EN EL PATRÓN DE DIFRACCIÓN (PUNTO FOCAL) DE UN OBJETIVO DE MICROSCOPIO.	38
FIGURA 4-3. SIMULACIÓN DE LA PSF RESULTANTE DE UNA PUPILA LIBRE (IZQUIERDA) Y UNA PUPILA DE ANILLO CON $D=3/4$ (DERECHA).	38
FIGURA 4-4. PERFIL DE LA PSF SIMULADA DE UNA PUPILA LIBRE (AZUL) Y DE UNA PUPILA ANULAR CON $D=3/4$ (VERDE).....	39
FIGURA 4-5. PSF EXPERIMENTAL DE UNA PUPILA LIBRE (IZQUIERDA) Y UNA PUPILA DE ANILLO (DERECHA).....	39
FIGURA 4-6. PERFIL DE LA PSF EXPERIMENTAL DE UNA PUPILA LIBRE (AZUL) Y UNA PUPILA ANULAR CON $D=3/4$ (VERDE).....	40
FIGURA 4-7. PUPILA DE FASE CON REDUCCIÓN DE 0.66 (IZQUIERDA) Y PERFIL DE LA PSF (DERECHA)(VERDE) EXPERIMENTAL Y PSF DE UNA PUPILA LIBRE (AZUL).	40
FIGURA 4-8. PUPILA COMPLEJA (IZQUIERDA) CON REDUCCIÓN DE 0.65 Y PUPILA LIBRE (DERECHA).....	41
FIGURA 4-9. PSF EXPERIMENTAL (IZQUIERDA) Y SU CORRESPONDIENTE PERFIL (DERECHA) (VERDE) Y PERFIL DE LA PSF DE LA PUPILA LIBRE MODULADA (AZUL).....	41
FIGURA 4-10. DISTANCIAS UTILIZADAS EN LA ADQUISICIÓN DE LOS HOLOGRAMAS.....	42
FIGURA 4-11. ILUMINACIÓN DE LA MUESTRA CON UNA PUPILA LIBRE. IMAGEN ADQUIRIDA (IZQUIERDA) E IMAGEN SIN FONDO (DERECHA)	43
FIGURA 4-12. A) RECONSTRUCCIÓN CON ENFOQUE DIGITAL EN EL NÚCLEO DE LA FIBRA, B) ZOOM.....	43
FIGURA 4-13. HOLOGRAMA ADQUIRIDO USANDO UNA PUPILA SUPERRESOLUTORA CON REDUCCIÓN DE 0.67. A) PUPILA UTILIZADA, B) HOLOGRAMA, C) HOLOGRAMA SIN FONDO, D) DISTORSIÓN EN EL PATRÓN DE DIFRACCIÓN.....	44
FIGURA 4-14. HOLOGRAMA ADQUIRIDO USANDO UNA PUPILA SUPERRESOLUTORA CON REDUCCIÓN DE 0.66. A) PUPILA UTILIZADA, B) HOLOGRAMA, C) HOLOGRAMA SIN FONDO, D) DISTORSIÓN EN EL PATRÓN DE DIFRACCIÓN.....	44
FIGURA 4-15. ILUMINACIÓN DE LA FIBRA ÓPTICA DESPLEGANDO UNA PUPILA TIPO AXICÓN. A) PUPILA, B) HOLOGRAMA, C) DISTORSIÓN EN EL PATRÓN DE DIFRACCIÓN.	45
FIGURA 4-16. HOLOGRAMA UTILIZANDO UNA PUPILA COMPLEJA CON REDUCCIÓN DE 0.66. A) PUPILA UTILIZADA, B) HOLOGRAMA C) PATRÓN DE DIFRACCIÓN.	46
FIGURA 4-17. FUNCIÓN DE TRANSFERENCIA DE MODULACIÓN CALCULADA A PARTIR DE LA PSF DE LA PUPILA SUPERRESOLUTORA COMPLEJA (VERDE) Y CON FINES DE COMPARACIÓN DE LA PUPILA LIBRE (AZUL). A) EXPERIMENTAL. B) SIMULACIÓN.	48
FIGURA 4-18. HOLOGRAMA RESULTANTE DE UTILIZAR UNA PUPILA TIPO ANILLO DE AMPLITUD. A) PUPILA UTILIZADA, B) HOLOGRAMA, C) PATRÓN DE DIFRACCIÓN, D) EL PATRÓN DE DIFRACCIÓN AHORA NO APARECE CERCA DEL CENTRO NI EN DIRECCIÓN PERPENDICULAR DESDE EL CENTRO DE LA FIBRA.	49
FIGURA 4-19. SUBSTRACCIÓN DEL FONDO EN EL HOLOGRAMA DE LA FIGURA 4-18.	49
FIGURA 4-20. AXICÓN DE AMPLITUD. A) IDEA DE LA PUPILA A UTILIZAR, B) PUPILA DESPLEGADA EN EL SLM DE FASE.	50
FIGURA 4-21. MEDIO PERFIL DE LA PUPILA TIPO AXICÓN DE AMPLITUD. A) NORMALIZADO DE 0 A 1, B) NORMALIZADA DE 0.5 A 1	51
FIGURA 4-22. RECONSTRUCCIÓN DEL NÚCLEO DE LA FIBRA. A) UTILIZANDO UNA PUPILA LIBRE. B) UTILIZANDO LA PUPILA TIPO AXICÓN DE AMPLITUD CON NORMALIZACIÓN DE 0.5-1.	51
FIGURA 4-23. P-POLARIZADOR LINEAL, FE- FILTRO ESPACIAL, L-LENTE COLIMADORA, DH-DIVISOR DE HAZ, OM-OBJETIVO DE MICROSCOPIO, M-MUESTRA, MO-MOTOR, V- VIDRIO ESMERILADO.....	52
FIGURA 4-24. RECONSTRUCCIÓN DEL NÚCLEO DE LA FIBRA CON ILUMINACIÓN PARCIALMENTE INCOHERENTE. A) UTILIZANDO UNA PUPILA LIBRE. B) UTILIZANDO LA PUPILA TIPO AXICÓN DE AMPLITUD CON NORMALIZACIÓN DE 0.5-1.....	52

FIGURA 4-25. ANÁLISIS DEL HOLOGRAMA DE LA FIGURA 4-22. A) HOLOGRAMA SIN FONDO, B) PERFIL DE LA LÍNEA ROJA MOSTRADA EN A) UTILIZANDO UNA PUPILA LIBRE Y TIPO AXICÓN.....	53
FIGURA 4-26. REPRESENTACIÓN DEL RESULTADO SUPUESTO EN LA FUNCIÓN DE TRANSFERENCIA UTILIZANDO LA PUPILA TIPO AXICÓN.....	54
FIGURA 4-27. SIMULACIÓN DE LA PSF DE LA PUPILA TIPO AXICÓN DE AMPLITUD. A) NORMALIZACIÓN 0-1 Y B) NORMALIZACIÓN 0.5-1.....	54
FIGURA 4-28. FUNCIÓN DE TRANSFERENCIA DE MODULACIÓN OBTENIDA DE LA SIMULACIÓN DE LA PSF DE LA PUPILA TIPO AXICÓN DE AMPLITUD CON NORMALIZACIÓN 0-1.	55
FIGURA 5-1. PROPAGACIÓN DEL CAMPO EN EL ARREGLO DE DIHM SUPERRESOLUTOR.....	56
FIGURA 5-2. RUIDO EN LOS HOLOGRAMAS DE LA FIBRA. A) ILUMINACIÓN COHERENTE, B) ILUMINACIÓN PARCIALMENTE COHERENTE	58
FIGURA 5-3. FUNCIÓN DE TRANSFERENCIA DE MODULACIÓN DE LA PUPILA TIPO AXICÓN.....	59
FIGURA 5-4. RECONSTRUCCIÓN DEL NÚCLEO DE LA FIBRA CON ILUMINACIÓN COHERENTE. A) PUPILA LIBRE B) CON AXICÓN DE AMPLITUD	60

Contenido

1.	Introducción	1
1.1.	Resolución Óptica.....	2
1.1.1.	Criterio de Rayleigh	2
1.1.2.	Criterio de Sparrow	3
1.1.3.	Criterio de Abbe	3
1.2.	Hipótesis.....	4
1.3.	Arreglo Propuesto	5
2.	Microscopía Holográfica	7
2.1.	Introducción	7
2.2.	Interferencia.....	7
2.3.	Holografía	8
2.4.	Microscopía Holográfica.....	12
2.5.	Microscopía Holográfica de Gabor.....	13
2.6.	Reconstrucción en DIHM.....	15
2.7.	Resolución en DIHM.....	16
3.	Superresolución.....	17
3.1.	Técnicas de superresolución	17
3.1.1	Superresolución mediante Abertura Sintética	17
3.1.2	Superresolución por Phase Shifting en DIHM [15].....	19
3.1.3	Superresolución en Microscopía Confocal.....	19
3.2	Moduladores espaciales de luz	21
3.3	Función de Transferencia de un Sistema Óptico.....	23
3.3.1	Respuesta a la frecuencia de un sistema incoherente limitado por difracción	24
3.3.2	Respuesta a la frecuencia de un sistema Coherente Limitado por Difracción	24
3.4	Pupilas Superresolutoras.....	25
3.4.1	Pupilas anulares	25

3.4.2	Pupilas de Toraldo Di Francia basadas en la teoría de antenas de S. A. Schelkunoff	26
3.4.3	Otros tipos de pupilas	31
4	Desarrollo	26
4.1	Introducción	36
4.2	Modulación Compleja en un modulador de Fase.	37
4.3	Reducción de la PSF.....	37
4.4	Pruebas de DIHM con pupilas superresolutoras.....	42
4.5	Primer análisis de la Función de Transferencia en DIHM.....	46
4.6	Pupila tipo axicón de amplitud.....	50
4.7	Segundo Análisis de la función de transferencia en DIHM	53
4.8	Análisis de la pupila tipo axicón de amplitud	54
5.	Análisis.....	56
5.1.	Pupilas de Fase	56
5.2.	Pupilas de Amplitud en el modulador de Fase.....	57
5.3.	Iluminación coherente y parcialmente coherente.....	58
5.4.	Superresolución de la pupila tipo axicón.	59
6.	Conclusiones.....	61

1. Introducción

De acuerdo a la óptica geométrica no existe un límite para el poder de resolución de un sistema óptico perfecto. Sin embargo es bien sabido que de acuerdo a la óptica ondulatoria esta situación cambia considerablemente. De acuerdo a la óptica ondulatoria un punto focal está constituido por un patrón de difracción de dimensión diferente de cero [7].

El patrón de difracción de un punto focal proveniente de una lente puede ser descrito por la misma ecuación que describe la difracción (por aproximación de Fraunhofer) generada por un campo difractado por una abertura circular:

$$I = I_0 \left[\frac{2J_1(\rho)}{\rho} \right]^2 \quad (1.1)$$

Donde I es la intensidad del campo, J_1 es la función Bessel de primer orden y ρ es la coordenada radial. En la Figura 1-1 se muestra la gráfica del perfil de intensidad normalizado de un punto focal.

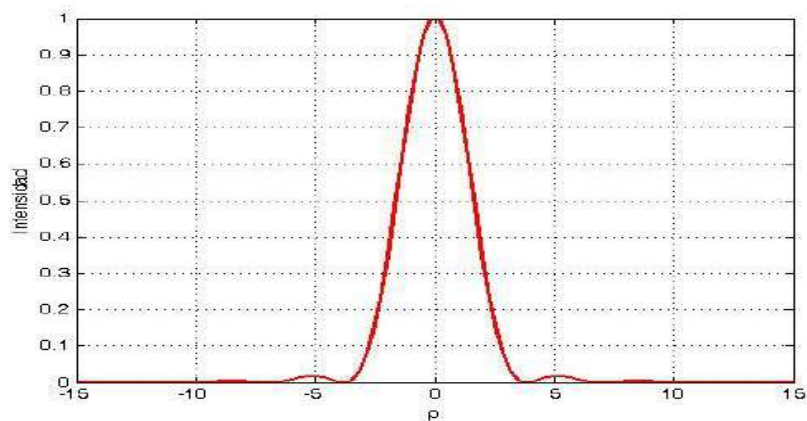


Figura 1-1. Perfil de intensidad de un punto focal (Ecu. (1.1)).

El patrón de difracción es simétricamente circular y consiste en un disco central brillante rodeado de anillos concéntricos circulares con una rápida disminución de intensidad. El área central brillante es llamada disco de Airy. Este disco es medido hasta el primer cero de la función Bessel en $\rho = 3.832$ [8]. El radio angular medido desde la abertura hasta el patrón de difracción está dado por:

$$\sin \theta = \frac{1.22\lambda}{D} \quad (1.2)$$

Donde D es el diámetro de la lente y θ es el semi-ángulo desde el eje óptico al primer cero del patrón de difracción.

Por lo tanto ya que el tamaño del patrón de difracción depende directamente de la longitud de onda y del diámetro de la abertura (o la lente) ahora nos preguntamos; ¿Qué tiene que ver el tamaño del disco de Airy con la resolución? Esto es lo que se analizará en la siguiente sección.

1.1. Resolución Óptica

1.1.1. Criterio de Rayleigh

La imagen de una fuente puntual distante formada en el plano focal de una lente de un telescopio óptico o de una cámara es un patrón de difracción de Fraunhofer para el cual la abertura es la dimensión de la lente. Por lo tanto la imagen de una fuente compuesta es la superposición de muchos discos de Airy. De este modo la resolución de la imagen depende del tamaño de los discos de Airy. Si D es el diámetro de la lente entonces el radio angular del disco de Airy es aproximadamente $1.22\lambda/D$. Esta separación es también la separación mínima angular entre dos fuentes puntuales iguales tal que sean apenas resueltas, usando esta separación angular el máximo central de una fuente cae en el primer mínimo de la otra. Esta condición para resolución óptica es conocida como el criterio de Rayleigh [8].

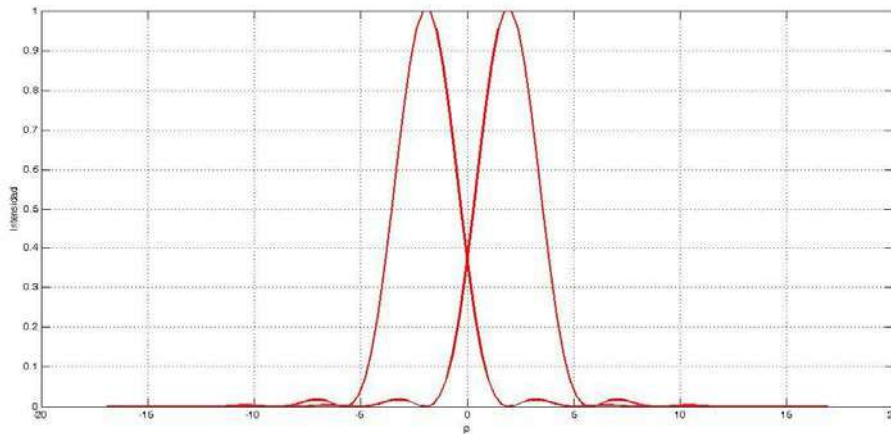


Figura 1-2. Criterio de Rayleigh

Esta separación entre discos de Airy también se puede escribir en términos de la distancia entre los dos discos de Airy que de hecho como se puede observar en la Figura 1-2. Criterio de Rayleigh, es igual al radio de uno de ellos:

$$r = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (1.3)$$

Donde NA es la abertura numérica de la lente igual a $n \sin \theta$

1.1.2. Criterio de Sparrow

El criterio de Sparrow establece que dos fuentes puntuales incoherentes son apenas resueltas si su separación es la máxima separación para la cual la imagen del par de puntos no muestra inclinación en el punto central [9]. En la Figura 1-3 se muestra la comparación entre el criterio de Rayleigh y el criterio de Sparrow.

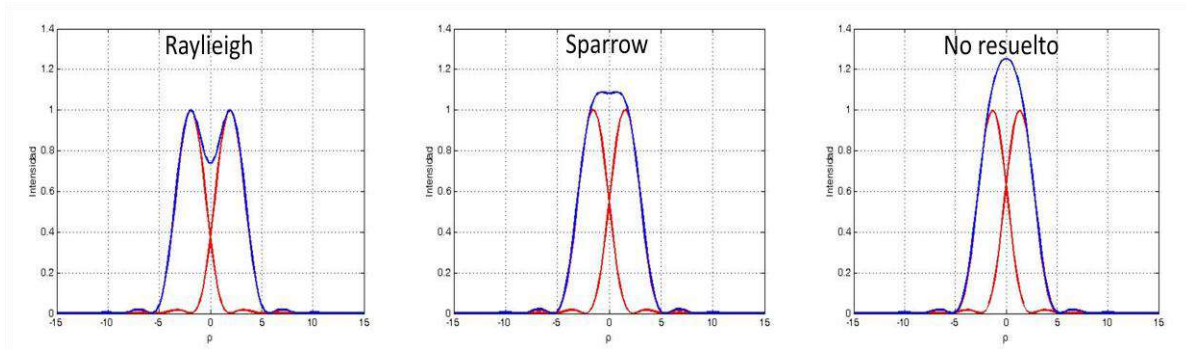


Figura 1-3. Comparación entre el criterio de Rayleigh, Sparrow y dos fuentes puntuales no resueltas.

De esta manera la resolución está limitada por:

$$r = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.4)$$

1.1.3. Criterio de Abbe

De acuerdo a la teoría de Abbe la resolución se define a partir de los componentes de difracción que el sistema óptico detecta, esto es: solo una porción de componentes difractados por la muestra son interceptados por la entrada de la pupila del sistema, que es de tamaño finito. Los componentes no detectados por la pupila de entrada son precisamente aquellos que son generados por componentes de alta frecuencia en la muestra. En la Figura 1-4 se muestra una representación de los rayos difractados por un objeto, causando que algunos no formen parte de la imagen del objeto formada por la lente.

En el caso de iluminación coherente, el criterio de resolución de Abbe resulta en un límite dado por la ecuación (1.5) [42].

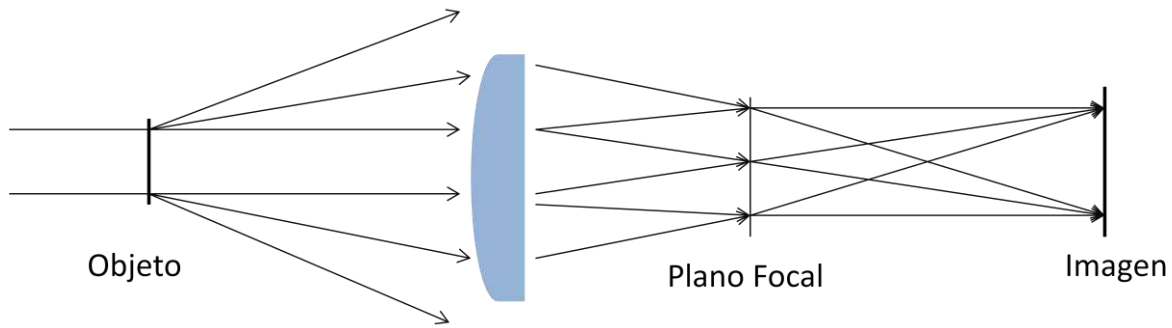


Figura 1-4. Esquemmatización de la influencia de la difracción en un sistema de formación de imágenes de una lente para describir el Criterio de Abbe.

$$r = 0.77 \frac{\lambda}{NA} \quad (1.5)$$

1.2. Hipótesis

De acuerdo a lo anterior sabemos que la resolución óptica de un microscopio o de cualquier otro sistema óptico que incluya lentes está limitada por el tamaño del disco de Airy de su o sus lentes. Sin embargo esto es cierto solo para lentes con aberturas circulares libres.

La investigación sobre pupilas anulares superresolutoras en formación de imágenes ópticas lleva muchos años. Primero fue investigada por Airy en 1840, Rayleigh mostró que la PSF para un anillo estrecho puede ser expresada en términos de la función Bessel y que por lo tanto el disco de Airy puede disminuirse de tamaño pero acompañado por anillos concéntricos más intensos [10]. Años después también fueron investigadas para mejorar también la profundidad de foco. En 1952 Toraldo Di Francia [7] propuso arreglos de múltiples anillos basados en la teoría de ganancia en antenas que reducen considerablemente el tamaño del disco de Airy. Estas pupilas de un anillo o múltiples anillos es lo que llamamos pupilas superresolutoras. Aunque también se incluyen otros tipos de pupilas como los vórtices [13] y los axicones [12], aclarando que los axicones no fueron inventados como pupilas sino como elementos ópticos.

En 1986 se propuso utilizar pupilas superresolutoras en un microscopio confocal [11]. Es decir la idea fue tomar imágenes escaneando muestras con un punto focal generado por un objetivo de microscopio con una pupila superresolutora como entrada.

Partiendo del criterio de resolución y del concepto de superresolución con pupilas, la idea principal del presente trabajo es utilizar pupilas superresolutoras para tomar imágenes de microscopía en campo lejano. Actualmente es posible generar cualquier tipo de pupila superresolutora mediante un SLM (modulador espacial de luz).

Con estos conceptos podemos pensar en un arreglo simple para lograr este objetivo:

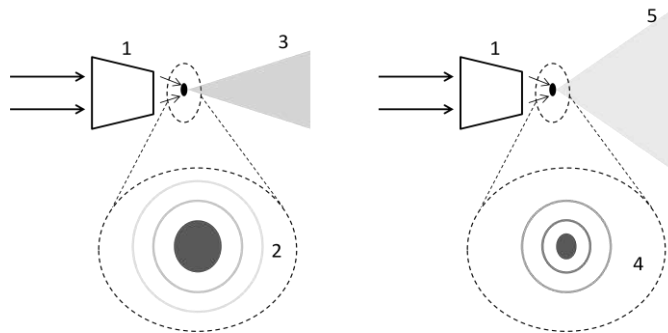


Figura 1-5. Esquematación del efecto de la resolución óptica. Sin pupila superresolutora (Izquierda), con pupila superresolutora (derecha). 1. Objetivo de microscopio, 2. Representación de la distribución del punto focal, 3 Propagación del punto focal, 4 representación de la distribución del punto focal con superresolución, 5. Propagación del punto focal más pequeño que el de la izquierda.

De acuerdo a las ecuaciones que describen el límite de resolución es intuitivo pensar en lo que pasaría con un punto focal al propagarse si este es de menor tamaño: en la Figura 1-5. Esquematación del efecto de la resolución óptica. Sin pupila superresolutora (Izquierda), con pupila superresolutora (derecha). 1. Objetivo de microscopio, 2. Representación de la distribución del punto focal, 3 Propagación del punto focal, 4 representación de la distribución del punto focal con superresolución, 5. Propagación del punto focal más pequeño que el de la izquierda. se muestra como el punto focal de la izquierda se propaga con un ángulo menor que el punto focal de la derecha (con mejor resolución).

Si disminuimos el radio del disco de Airy entonces también debe de cambiar la propiedad de magnificación del haz. Por lo tanto si tomáramos una imagen con este campo propagado que contiene propiedades de magnificación de acuerdo al tamaño del punto focal del que proviene, entonces podríamos mejorar la resolución óptica si utilizáramos pupilas superresolutoras en lugar de modificar los parámetros de la ecuación (1.4) o (1.3). Esto último es la hipótesis del presente trabajo.

1.3. Arreglo Propuesto

En base a la hipótesis el arreglo experimental para demostrar la superresolución en campo lejano fue el microscopio óptico holográfico de Gabor. La razón fue que este microscopio es de hecho exactamente el mismo arreglo que el de la Figura 1-5. Esquematación del efecto de la resolución óptica. Sin pupila superresolutora (Izquierda), con pupila superresolutora (derecha). 1. Objetivo de

microscopio, 2. Representación de la distribución del punto focal, 3 Propagación del punto focal, 4 representación de la distribución del punto focal con superresolución, 5. Propagación del punto focal más pequeño que el de la izquierda. excepto por que en el microscopio holográfico de Gabor el campo propagado proviene de un pinhole en lugar de un punto focal libre, tal como se muestra en la Figura 1-6. Además en nuestro caso el campo a la entrada del objetivo de microscopio proviene de un modulador espacial de luz (SLM) con el objetivo de introducir la función de pupila superresolutora.

De aquí en adelante microscopía holográfica de Gabor se abreviará como DIHM (Digital In Line Holographic Microscopy) o simplemente Microscopía de Gabor. Aunque DIHM es como se le nombra más comúnmente en la literatura.

En la sección 2 se repasará la teoría de holografía y al final se explicará la técnica de DIHM, en la sección 3 se expondrán algunas de las técnicas de superresolución en campo lejano ya existentes que son muy distintas a la que se estudia en el presente trabajo, se explicará brevemente la teoría de los moduladores espaciales de luz (SLM), también se expondrá la descripción de resolución desde el concepto de función de transferencia y por último las pupilas superresolutoras. En los capítulos 4, 5 y 6 se expondrán el desarrollo del trabajo, análisis y conclusiones, respectivamente.

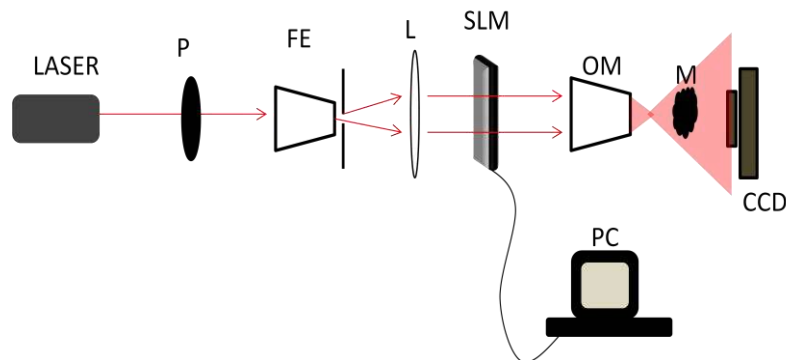


Figura 1-6. Arreglo experimental propuesto. P-Polarizador Lineal, FE- Filtro espacial, L- Lente colimadora, OM- Objetivo de Microscopio, M-Muestra.

2. Microscopía Holográfica

2.1.Introducción

Hace más de cincuenta años que fue propuesto un nuevo principio en microscopía electrónica para superar las limitaciones de las lentes magnéticas, este nuevo principio propuesto por Dennis Gabor es conocido ahora como holografía en línea, holografía sin lentes u holografía de Gabor. La holografía de Gabor es la forma más simple de realizar holografía [1].

Un holograma es la grabación de un patrón de interferencia entre un frente de onda proveniente de un objeto y un frente de onda de referencia. Un holograma es usualmente grabado en una superficie plana tal como en un CCD, pero a pesar de ello contiene información del frente de onda tridimensional [2].

En el presente capítulo se repasa la teoría de interferencia (la cual es la base de la holografía), holografía, microscopía holográfica y por último se expone particularmente la técnica de holografía de Gabor en microscopía óptica utilizada en el presente trabajo.

2.2.Interferencia

La interferencia es un fenómeno básico en el cual está basada la holografía. En el caso de ondas planas, la interferencia puede resultar en dos tipos de patrones: en una franja infinita y en franjas de ancho finito [3]. El primer tipo de interferencia sucede cuando las ondas que interactúan viajan en la misma dirección. En este caso obtenemos el patrón resultante con una distribución de intensidad uniforme. La ecuación principal de interferencia de dos ondas coherentes linealmente polarizadas $A_1(x, y) = a_1 e^{-i\phi_1(x,y)}$ y $A_2(x, y) = a_2 e^{-i\phi_2(x,y)}$ tiene la forma:

$$I = a_1^2 + a_2^2 + 2a_1 a_2 \cos(\phi_2 - \phi_1) \cos(\beta) \quad (2.1)$$

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(\phi_2 - \phi_1) \cos(\beta) \quad (2.2)$$

Donde I es la intensidad resultante ϕ_2 y ϕ_1 el término de fase de cada onda, a_2 y a_1 las amplitudes de cada onda I_2 , I_1 las intensidades de las ondas, β es el ángulo entre la dirección de polarización lineal de las ondas. ϕ_2 y ϕ_1 pueden ser funciones complicadas y podrían ocasionar patrones de interferencia muy complejos, sin embargo como se especificó antes, aquí estamos hablando solamente de ondas planas.

Si las ondas tienen la misma intensidad y la misma dirección de polarización, es decir $\beta = 0^\circ$ entonces:

$$I = 2I_0[1 + \cos(\phi_2 - \phi_1)] \quad (2.3)$$

De esta manera la intensidad resultante es modulada por la diferencia de fase de las ondas. Un cambio en la diferencia de fase resulta en un cambio en la intensidad. Cuando $\phi_2 - \phi_1 = 2\pi m$ donde $m = 0, 1, 2 \dots$ la intensidad resultante es máxima y es igual a $I_{max} = 4I_0$, si $\phi_2 - \phi_1 = 2(m + 1)\pi$, la intensidad resultante es igual a $I_{min} = 0$, es decir las ondas se eliminan entre sí. El otro tipo de interferencia sucede cuando hay un ángulo θ entre las ondas. En este caso en lugar de tener un campo homogéneo, se obtiene un campo con franjas, con alternación de intensidad máxima y mínima uniforme. La ecuación de interferencia correspondiente tiene la forma:

$$I = 2I_0\left\{1 + \cos\left[(\phi_2 - \phi_1) - \frac{2\pi x}{T}\right]\right\} \quad (2.4)$$

Donde T es el periodo de las franjas de interferencia, (x, y) es el plano de observación. El periodo del patrón de franjas de interferencia T es igual a:

$$T = \frac{\lambda}{2 \sin(\theta/2)} \quad (2.5)$$

Donde λ es la longitud de onda de la luz. El periodo del patrón de interferencia decrece si el ángulo entre las ondas incrementa [3].

2.3.Holografía

La holografía es el método de grabado y reconstrucción basado en el registro de un patrón de interferencia producido por dos ondas coherentes: La onda proveniente del objeto y la onda de referencia. Si consideramos objetos transparentes, en Figura 2-1 se muestra un arreglo holográfico común (existen distintas variantes de arreglos holográficos).

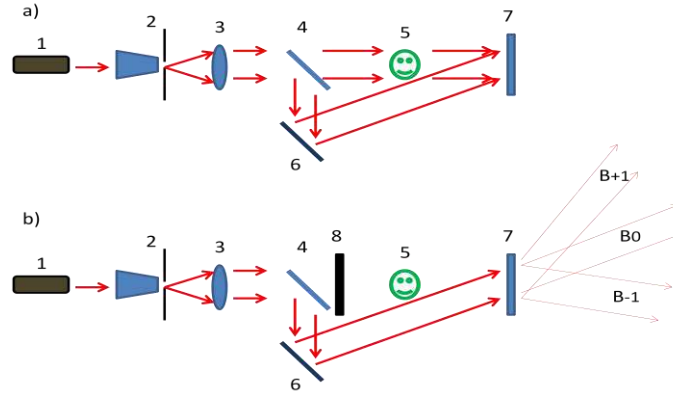


Figura 2-1. a) Arreglo óptico para realizar holografía, b) arreglo óptico para reconstrucción del holograma. 1-Láser, 2-Filtro espacial, 3-Lente, 4-Divisor de haz, 5-Objeto, 6-Espejo, 7-Holograma, 8-Pantalla Opaca.

El rayo coherente (Fig. 2.1) proveniente del láser 1 es expandido y colimado por el filtro espacial 2 y la lente 3. El divisor de haz 4 divide el rayo expandido en dos rayos: El haz objeto y el haz de referencia. El haz de referencia B_2 es dirigido al espejo 6 y reflejado hacia la placa holográfica 7. El haz objeto B_1 pasa a través del objeto en estudio 5 y es dirigido de la misma manera hacia la placa holográfica 7.

Expresando lo anterior matemáticamente. El holograma es producido por la interferencia entre los haces B_1 y B_2 . Suponiendo que los haces tienen la misma polarización. $A_1(x, y)$ es la amplitud compleja del haz objeto y A_2 la amplitud compleja del haz de referencia en el plano (x, y) de la placa holográfica.

$$A_1(x, y) = a_1(x, y)e^{-i\phi_1(x, y)} \tag{2.6}$$

$$A_2(x, y) = a_2(x, y)e^{-i\phi_2(x, y)}$$

Donde $a_1(x, y)$ y $\phi_1(x, y)$ son la amplitud y fase del haz objeto y $a_2(x, y)$ y $\phi_2(x, y)$ son la amplitud y fase del haz de referencia.

La amplitud compleja de la onda resultante en el plano del holograma es igual a:

$$A(x, y) = A_1(x, y) + A_2(x, y) \tag{2.7}$$

y consecuentemente la intensidad es igual a:

$$I(x, y) = A(x, y)A^*(x, y) \tag{2.8}$$

Donde $A^*(x, y)$ es el complejo conjugado.

Suponiendo que la onda transmitida por el objeto es dirigida hacia la placa holográfica en dirección normal a su superficie y el objeto cambia de fase solo sobre el eje x:

$$a_1(x, y) = a_1, \phi_1(x, y) = \phi_1(x) \quad (2.9)$$

Suponiendo que la onda de referencia es dirigida a la placa holográfica a un ángulo θ .

$$a_2(x, y) = a_2, \phi_2(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} x \sin(\theta) \quad (2.10)$$

Donde λ es la longitud de onda de la luz utilizada.

Entonces la intensidad del patrón de interferencia, producido por las ondas interactuando en el plano de la placa holográfica es determinada por la ecuación de interferencia principal (2.1).

$$I = a_1^2 + a_2^2 + 2a_1a_2 \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} x \sin(\theta) - \phi_1(x)\right) \quad (2.11)$$

Donde a_1^2 es la intensidad de la onda objeto y a_2^2 es la intensidad de la onda de referencia. De esta ecuación se puede observar que el patrón de interferencia resultante es una alternación de franjas oscuras y brillantes. Donde la posición de las franjas depende de la fase $\phi_1(x)$ de la onda del objeto:

$$x_{max} = \frac{[2m\pi + \phi_1(x)]\lambda}{2\pi \sin(\theta)} \quad (2.12)$$

$$x_{min} = \frac{[(2m + 1)\pi + \phi_1(x)]\lambda}{2\pi \sin(\theta)} \quad (2.13)$$

Donde $m = 0, 1, 2, \dots$

Así la información de la fase del haz objeto es codificada en el patrón de franjas grabado en la placa holográfica.

La información de las amplitudes de las ondas es codificada en el contraste v de las franjas de interferencia:

$$v = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (2.14)$$

Donde I_{max} e I_{min} son los valores máximos y mínimos de las franjas de interferencia.

Utilizando la ecuación 2.11 se puede obtener:

$$v = \frac{2a_1 a_2}{a_1^2 + a_2^2} \quad (2.15)$$

Así la amplitud del haz objeto a_1 es determinada solamente si la amplitud del haz de referencia a_2 es constante.

Por lo tanto, el patrón de interferencia entre el haz objeto y el haz de referencia contiene información de la fase y amplitud del frente de onda proveniente del objeto.

El objeto considerado anteriormente es simple ya que se propuso solamente el cambio de fase en solo una dirección. A pesar de ello los resultados de esta consideración pueden ser utilizados para objetos más complicados.

Ahora considerando el proceso de reconstrucción (Figura 2-1), la placa holográfica 7 es iluminada por el mismo haz de referencia que fue utilizado para el proceso de grabado del holograma y el haz objeto es bloqueado por la pantalla opaca 8. Debido al fenómeno de difracción de luz en el patrón de interferencia grabado en el holograma, se obtienen tres haces: el haz no difractado B_0 y dos haces difractados B_{+1} y B_{-1} . Los dos haces difractados son los responsables de la reconstrucción 3D de la imagen del objeto.

Ahora se describirá matemáticamente el proceso de reconstrucción. Se considerará el caso, cuando la distribución de intensidad del patrón de interferencia es grabada como variaciones del coeficiente de absorción de la placa holográfica. En este caso la amplitud del haz transmitido a través del holograma depende de la amplitud de transmisión del holograma τ_a . En caso de dependencia lineal de la amplitud de transmisión del holograma con la intensidad de luz

$$\tau_a = k I(x, y) \quad (2.16)$$

Donde k es constante e $I(x, y)$ es la distribución de intensidad en el patrón de interferencia grabado. De esta manera, si el holograma es iluminado por el haz de referencia, entonces la amplitud compleja de la onda transmitida es igual a:

$$A(x, y) = \tau_a A_2 = k I(x, y) A_2 \quad (2.17)$$

Substituyendo la ecuación 2.10 en 2.6 y las ecuaciones 2.6 y 2.11 en 2.17 se obtiene:

$$A'(x) = k_1 a_2 e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}x \sin(\theta)} + k_2 a_1 e^{-i\phi_1(x)} + k_2 a_1 e^{-i[\frac{4\pi}{\lambda}x \sin(\theta) - \phi_1(x)]} \quad (2.18)$$

Esta ecuación puede ser considerada como la ecuación principal en la holografía. El primer término corresponde al haz directo (sin difractar) B_0 Figura 2-1., el segundo término corresponde al haz difractado B_{-1} , el cual forma la imagen virtual (el frente de onda reconstruido del objeto), y el tercer término corresponde al haz difractado B_{+1} , el cual forma la imagen real. Se puede observar de la ecuación 2.18 que el haz B_{+1} (tercer término) difiere por un valor de fase de $-\frac{4\pi}{\lambda}x \sin(\theta)$ de la fase original del frente de onda del objeto, y es la razón de que la imagen real esté deformada.

Por lo tanto el método holográfico permite grabar y reconstruir la amplitud y fase del frente de onda proveniente del objeto; la imagen virtual reconstruida es una réplica de la imagen del objeto. Por lo tanto, la holografía permite la obtención de imágenes 3D de objetos [3].

2.4. Microscopía Holográfica

En el principio del desarrollo de la microscopía holográfica se investigaba la posibilidad de magnificación de la imagen sin utilizar sistemas ópticos. La magnificación se puede obtener mediante el uso de diferente longitud de onda de la luz entre las etapas de grabado y reconstrucción del holograma, incrementando el tamaño del holograma o utilizando diferente divergencia en los haces de grabado y reconstrucción. El primer arreglo de microscopio holográfico óptico sin lentes fue propuesto por E.N. Leith y Upatnieks [4]. La magnificación en el microscopio fue conseguida mediante el uso de haces con diferente divergencia entre las etapas de grabado y reconstrucción del holograma. De este modo se logró obtener una imagen con 150x de magnificación y una resolución de $5\mu\text{m}$.

Para obtener una gran magnificación, es necesario utilizar un objetivo en el arreglo de microscopio.

La aplicación de holografía a la microscopía con más éxito fue con un sistema que combinaba la holografía con la microscopía convencional. El primer microscopio holográfico que utilizó un microscopio óptico fue realizado por R.F van Lighten y G.Ostenberg en 1966 (Figura 2-2). Mediante el microscopio óptico se magnificó la imagen y se grabó el holograma.

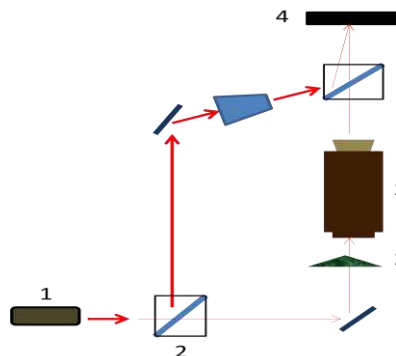


Figura 2-2. Arreglo óptico de microscopio holográfico. 1-Láser, 2-Muestra, 3-Microscopio, 4-Holograma

La principal característica de un microscopio es la resolución óptica. La resolución óptica de un microscopio clásico se determina por dos parámetros: La longitud de onda de la luz utilizada y la abertura numérica del objetivo $n \sin(u)$. En el caso de que la fuente de luz utilizada no sea coherente, la mínima distancia entre dos puntos resueltos es determinada por la formula:

$$d \geq \frac{0.6 \lambda}{n \sin(u)} \quad (2.19)$$

Donde u es el ángulo de abertura, n es el índice de refracción del medio. Utilizando un líquido de inmersión, es posible incrementar la abertura numérica hasta mayor que 1; y la distancia mínima resoluble entre dos puntos es alrededor de la mitad de la longitud de onda utilizada. En el caso del microscopio holográfico la radiación utilizada es un láser coherente. En este caso la resolución óptica del microscopio es determinada por la formula:

$$d \geq \frac{\lambda}{n \sin(u)} \quad (2.20)$$

De este modo, la distancia mínima resoluble entre dos detalles del objeto microscópico en estudio es del orden de la longitud de onda. El empeoramiento de la resolución óptica en el microscopio holográfico es el principal defecto del método holográfico [3].

2.5. Microscopía Holográfica de Gabor

A finales de 1940, más de una década después de la invención del microscopio electrónico, el principal obstáculo para su implementación práctica era el hecho de que las lentes magnéticas para electrones estaban muy lejos de ser ideales ya que presentaban aberraciones considerables. Fue cuando Dennis Gabor surgió con la idea de deshacerse de las lentes magnéticas y utilizar solo una lente "perfecta", un pinhole o fuente puntual de menor tamaño o del orden de la longitud de onda. De tal modo que de la fuente puntual emanara una fuente esférica con un cono de medio ángulo θ dado por la abertura numérica:

$$n \sin(u) = NA = 0.62 \frac{\lambda}{r} \quad (2.21)$$

Donde λ es la longitud de onda de la radiación que ilumina al pinhole y r su radio. Una fuente puntual como tal tiene la ventaja de poseer coherencia espacial ya que la radiación que emite se

origina del mismo punto en el espacio [5]. Por otra parte, es una onda en expansión y por tanto contiene perfecta magnificación por sí misma. En la Figura 2-3 se muestra un esquema del arreglo de Gabor.

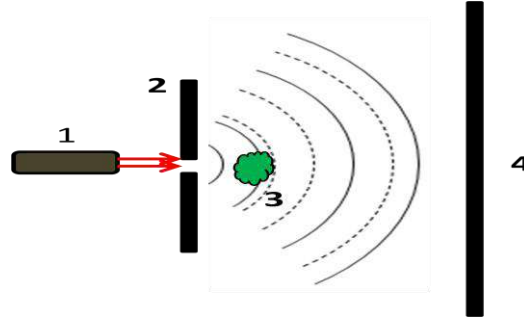


Figura 2-3. Arreglo óptico de microscopio holográfico de Gabor. 1-Láser, 2-Pinhole, 3-Muestra, 4-Holograma. Las líneas punteadas representan el frente de onda esparcido (por la muestra) y las líneas solidas el frente de onda de referencia.

La luz emanando de la fuente puntual se propaga hacia la pantalla donde se graba el holograma con cierta parte de ella esparcida por el objeto o la muestra enfrente de la fuente puntual. De esta manera la amplitud de la onda en la pantalla está dada por:

$$A(r) = A_{ref}(r) + A_{scat}(r) \quad (2.22)$$

Y la intensidad grabada en la pantalla:

$$I(r) = A(r)A^*(r) \quad (2.23)$$

$$= A_{ref}(r)A^*_{ref}(r) + [A_{ref}(r)A^*_{scat}(r) + A_{scat}(r)A^*_{ref}(r)] + A_{scat}(r)A^*_{scat}(r)$$

El primer término es la intensidad de la onda de referencia no esparcida, el último término es la intensidad de la onda esparcida; tema de la teoría de difracción. Los dos términos dentro de los corchetes representan la interferencia entre la onda de referencia y la onda esparcida. Esto es llamado difracción holográfica y es la base de la holografía [5].

Entonces es necesario hacerse una pregunta: ¿Cuándo domina la difracción holográfica y cuando la interferencia? La respuesta es clara: Si el objeto bloquea la mayor parte de la onda de referencia la onda esparcida solo interferirá consigo misma si es que es suficientemente coherente. Por otra parte si el objeto bloquea solo una pequeña parte de la onda de referencia lo que dominará es la difracción holográfica y esto producirá un complicado patrón de interferencia en la pantalla. El hecho de que la intensidad holográfica es lineal en la amplitud de esparcimiento tiene dos consecuencias matemáticas importantes: 1; Se sostiene el principio de superposición, es decir es

posible sumar dos o más hologramas sin perder información, 2; La amplitud esparcida grabada en el holograma puede ser llevada de regreso hacia el objeto y así extraer la información incluyendo la fase. Esto esencialmente es la razón de porqué, mediante un procedimiento inverso, se puede extraer el frente de onda desde donde se desee, así creando una imagen 3D de un grabado 2D [5].

El desarrollo de un algoritmo rápido y eficiente para la reconstrucción en la década de 1990 condujo a la aparición de la holografía de Gabor (DIHM: Digital In-Line Holographic Microscopy) como herramienta para la adquisición de imágenes de múltiples aplicaciones incluyendo hasta 4D con resolución sub-segundo y sub-micra [5].

2.6. Reconstrucción en DIHM

La reconstrucción en DIHM es realizada numéricamente basada en la teoría de propagación de ondas mediante difracción hacia atrás del patrón de difracción grabado en el holograma 2D por medio de la onda de referencia [5]. El método de espectro angular ecu. (2.24), la difracción de Fresnel, la difracción de Fraunhofer entre otras, son técnicas de aproximación las cuales deben ser usadas de acuerdo con las condiciones experimentales, tal como la distancia de propagación.

$$U(x, y; z) = F^{-1}\{ F\{U(x_0, y_0)\} * e^{ik\sqrt{1-\alpha^2-\beta^2} z} \} \quad (2.24)$$

De la ecuación 2.24 $F\{\}$ y $F^{-1}\{\}$ es la transformada de Fourier y la transformada inversa de Fourier, $U(x, y; z)$ es el campo propagado una distancia z en el plano (x, y) , $U(x_0, y_0)$ es la función que representa el holograma con la substracción de la referencia (la misma imagen pero sin muestra), y el ultimo término es el factor de propagación donde $\alpha = \lambda u$ y $\beta = \lambda v$.

La reconstrucción mediante espectro angular es efectiva cuando la distancia del objeto al CCD es corta. Si utilizamos la técnica de espectro angular, es posible utilizar un algoritmo de FFT y realizar el cálculo a gran velocidad. Por lo tanto si se utiliza un GPU es posible obtener la reconstrucción en tiempo real [6].

La técnica numérica de difracción más utilizada para realizar la reconstrucción en DIHM es la integral de Kirchhoff-Helmholtz:

$$U(X, Y; Z) = \int H(x_H, y_H) P_z(X - x_H, Y - y_H) dx_H dy_H \quad (2.25)$$

Donde:

$$P_z(X, Y) = \frac{e^{-\frac{i2\pi}{\lambda}(X^2+Y^2+Z^2)^{1/2}}}{(X^2 + Y^2 + Z^2)^{1/2}} \quad (2.26)$$

De igual forma que para el espectro angular $H(x_H, y_H)$ es el holograma con la substracción de la referencia. Esta ecuación puede ser utilizada cuando se cumple que la distancia del pinhole a la muestra es mucho menor que la distancia del pinhole al CCD [5] pág. 8.

2.7.Resolución en DIHM

La resolución en holografía de Gabor depende en varios parámetros y factores que pueden ser controlados: (1) El tamaño del pinhole, el cual controla la coherencia espacial de la fuente y el cono de iluminación; (2) la abertura numérica dada por la posición y el tamaño del sensor CCD; (3) la densidad y tamaño de pixeles, el rango dinámico; y (4) la longitud de onda [1].

El modelo propuesto por [1] concluye que la resolución lateral está dada por:

$$|\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1| \geq \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.27)$$

Con \mathbf{r}_2 y \mathbf{r}_1 representando vectores desde la fuente puntual hasta dos puntos equidistantes del eje óptico y posicionados en una línea paralela al plano del sensor y perpendicular al eje óptico. De modo que estos dos puntos representan la muestra. Y NA :

$$NA = \sin \theta = \frac{W}{2} \left[\frac{W^2}{2} + D^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (2.28)$$

Siendo W el ancho del sensor y D la distancia de la fuente puntual al sensor.

3. Superresolución

3.1. Técnicas de superresolución

A continuación se repasan los métodos de superresolución que son actualmente conocidos con el objetivo de exponer la diferencia entre la técnica desarrollada en el presente trabajo y algunos de los métodos existentes hasta la fecha.

3.1.1 Superresolución mediante Abertura Sintética

Los métodos de apertura sintética consisten en incrementar la apertura numérica del sistema mediante el control de la iluminación de la muestra en el proceso de grabado de la imagen. Por lo tanto se requiere más de una imagen para incrementar la resolución. Los métodos de apertura sintética se pueden clasificar en adquirir múltiples imágenes; 1) moviendo la muestra, 2) moviendo la fuente de luz, 3) colocando rejillas con el fin de que los rayos que normalmente se desviarían reincidentan en el detector.

Un ejemplo, consiste en colocar la muestra en diferentes posiciones respecto a la iluminación de la fuente puntual tal como se aprecia en siguiente Figura:

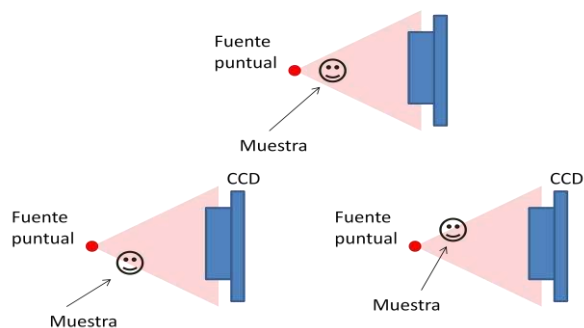


Figura 3-1. Ejemplo de apertura sintética.

De este modo se obtiene información de la muestra desde diferentes ángulos y finalmente se puede utilizar el conjunto de imágenes grabadas para la reconstrucción de una sola imagen con superresolución. Esta técnica se realiza en la referencia [14].

Comúnmente para la apertura numérica se necesita más de una imagen, sin embargo existe una técnica [5] (capítulo 12), donde se utiliza una sola imagen. Consiste en utilizar una rejilla de fase de óxido de indio y estaño, en la cual se puede aplicar un cambio de fase controlado por voltaje en la dirección z del cristal. En la Figura 3-2. Arreglo de superresolución mediante apertura sintética con una rejilla periódica hexagonal de fase. se muestra el arreglo utilizado en esta técnica.

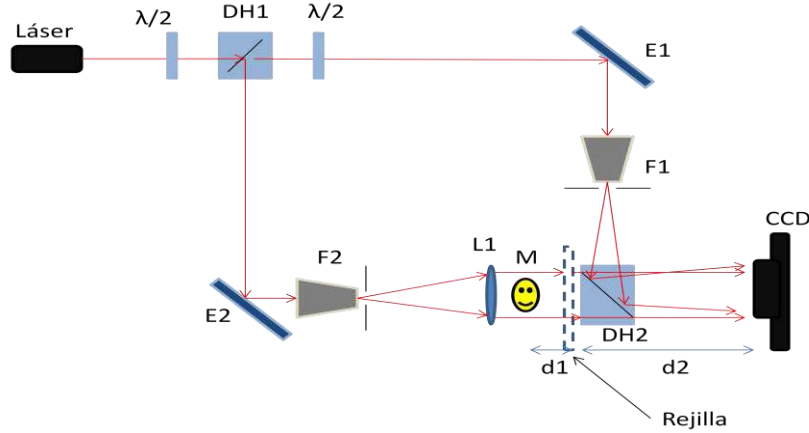


Figura 3-2. Arreglo de superresolución mediante apertura sintética con una rejilla periódica hexagonal de fase. E-Espejo, DH-Divisor de Haz, F-Filtro Espacial, $\lambda/2$ -Placa de Media Onda, M-Muestra, L-Lente Colimadora.

En esta técnica la superresolución se realiza en una configuración de holografía fuera de plano. La apertura sintética es creada mediante el re-direccionamiento de los rayos difractados por la muestra de nuevo hacia el sensor. El re-direccionamiento de los rayos se realiza mediante una rejilla de fase hexagonal controlada por voltaje. De modo que la reconstrucción en el plano (x_0, y_0) es realizada mediante la ecuación:

$$b(x_0, y_0) = \frac{1}{i\lambda d_1} e^{\frac{i\pi}{\lambda d_1}(x_0^2 + y_0^2)} \iint b(x_1, y_1) T(x_1, y_1) e^{\frac{i\pi}{\lambda d_1}[x_1^2 + y_1^2]} e^{\frac{2i\pi}{\lambda d_1}[x_1 x_0 + y_1 y_0]} dx_1 dy_1 \quad (3.1)$$

Donde $T(x_1, y_1)$ es la función de la rejilla y $b(x_1, y_1)$ es:

$$b(x_1, y_1) = \frac{1}{i\lambda d_2} e^{\frac{i\pi}{\lambda d_2}(x_1^2 + y_1^2)} \iint r(x_2, y_2) h(x_2, y_2) e^{\frac{i\pi}{\lambda d_2}[x_2^2 + y_2^2]} e^{\frac{2i\pi}{\lambda d_2}[x_2 x_1 + y_2 y_1]} dx_2 dy_2 \quad (3.2)$$

Donde $r(x_2, y_2)$ es el campo de referencia y $h(x_2, y_2)$ es el holograma grabado en el CDD. Esta integral es la integral de difracción de Fresnel, que funciona en la propagación de campo cercano. La función de la rejilla $T(x_1, y_1)$ es la responsable de re-direccionar los rayos hacia el sensor, tal como se muestra en la Figura 3-3. Rejilla hexagonal. Las líneas punteadas representan los rayos que se desviarían hacia fuera del sensor si la rejilla no estuviera eléctricamente polarizada y las líneas solidas representan los rayos capturados por el sensor cuando es aplicado un voltaje a la rejilla.

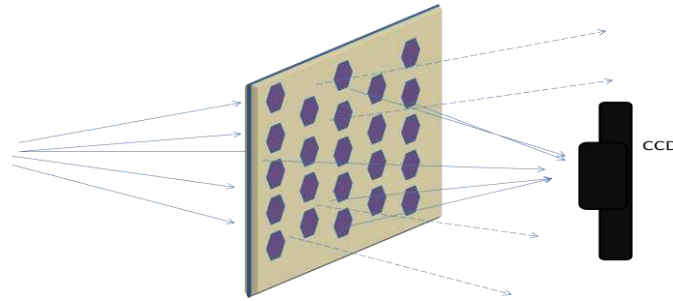


Figura 3-3. Rejilla hexagonal. Las líneas punteadas representan los rayos que se desviarían hacia fuera del sensor si la rejilla no estuviera eléctricamente polarizada y las líneas sólidas representan los rayos capturados por el sensor cuando es aplicado un voltaje a la rejilla.

En este método la resolución está dada por el tamaño de pixel del CCD cuando $d_1 = d_2$. Y según [5] el mejoramiento es de hasta 3 veces la resolución.

3.1.2 Superresolución por Phase Shifting en DIHM [15]

La muestra se coloca en el camino óptico de un haz enfocado aproximadamente a la mitad del camino de la distancia focal, exactamente en el punto focal se encuentra el modulador espacial de luz y se adquieren 64 imágenes de la muestra al mismo tiempo que se realiza un cambio de fase en el pixel que corresponde al disco de Airy en el modulador. El arreglo se muestra en la Figura 3-4. Phase shifting DIHM.

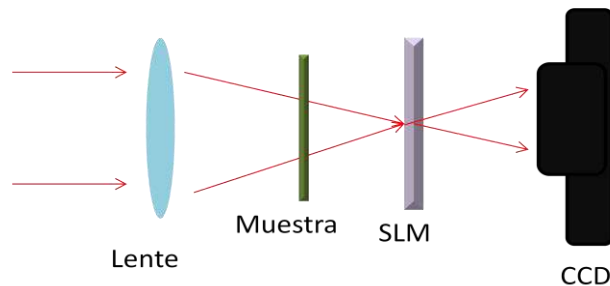


Figura 3-4. Phase shifting DIHM.

En el proceso de reconstrucción se realiza un algoritmo convencional de phase shifting para las 64 imágenes y después se realiza la propagación numérica tal como en la reconstrucción convencional. En la referencia [15] se utiliza la integral de Rayleigh Sommerfield y se muestran muy buenos resultados experimentales, aunque no hay un análisis matemático sobre el mejoramiento de la resolución en esta técnica.

3.1.3 Superresolución en Microscopía Confocal

La superresolución en microscopía confocal fue propuesta por primera vez por Z. S. Hegedus y V. Safaris en 1986 [16], en este arreglo de superresolución se propuso utilizar mascarar de tipo anillo

y basadas en la teoría de Toraldo Di Francia [7] para escanear muestras con un punto focal superresolutor. El arreglo se muestra en la Figura 3-5. Superresolución en Microscopía Confocal.

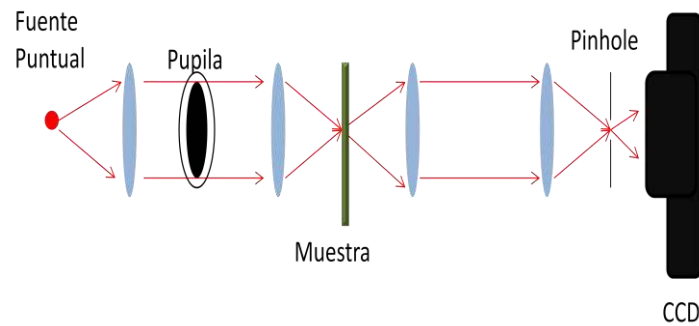


Figura 3-5. Superresolución en Microscopía Confocal.

El principio de esta técnica está basado en que la $PSF_{Total} = PSF_1 * PSF_2$ donde * denota el operador de convolución [16]. En la Figura 3-5. Superresolución en Microscopía Confocal. PSF_1 es la Función de Respuesta al impulso del primer conjunto de lentes incluyendo la pupila, y PSF_2 es la Función de Respuesta al impulso del segundo conjunto de lentes incluyendo la pupila que en este caso es libre. Por lo tanto la resolución en este sistema está dado por el disco de Airy de la PSF_{Total} .

Otra manera de mejorar la resolución del sistema confocal es utilizar una configuración llamada 4pi, que consiste en un arreglo similar al microscopio confocal, pero iluminando la muestra por ambos pares de lentes. Cabe resaltar que esta técnica mejora por sí misma la resolución más allá del límite de difracción sin el uso de pupilas superresolutoras. Sin embargo como ya se mencionó en el primer capítulo estas técnicas funcionan escaneando la muestra y por lo tanto solo hacemos referencia a ellas porque son técnicas en las que se han aplicado pupilas superresolutoras como las que se utilizan en el presente trabajo. En las referencias [17], [18] se explica esta técnica con más detalle.

Una desventaja de las técnicas de microscopía confocal es que es necesario escanear la muestra y por lo tanto toma mucho más tiempo la adquisición, en comparación con el tiempo de adquisición de un microscopio holográfico de Gabor. Otra desventaja es la potencia máxima que puede ser utilizada sin dañar la muestra. Con esto nos referimos al caso de muestras biológicas, ya que al enfocar un haz sobre una muestra concentramos toda la energía de la fuente de iluminación en un área muy pequeña, lo cual puede modificar fisiológicamente la muestra mediante procesos térmicos.

Respecto a las técnicas de abertura sintética es necesario adquirir por lo general mínimo 3 imágenes para obtener superresolución, aumentando por mucho el tiempo de adquisición. Esta limitación parece ser resuelta por el arreglo de la Figura 3-2. Arreglo de superresolución mediante abertura sintética con una rejilla periódica hexagonal de fase., sin embargo si analizamos este arreglo, la técnica no es microscopía holográfica, sino que solo es holografía. La aplicación de esta técnica para microscopía holográfica no ha sido estudiada aún.

En cuanto a la técnica de phase shifting en DIHM, en la referencia [15] se menciona que el pixel que realiza el cambio de fase debe de ser más pequeño que el disco de Airy formado por el sistema, por lo tanto la técnica está directamente limitada al tamaño de los pixeles del modulador, que son del orden de varias unidades de micrómetro. Y al igual que las técnicas antes mencionadas también está limitada por el tiempo de adquisición, ya que en el resultado experimental de la referencia [15] se requirieron 64 imágenes.

3.2 Moduladores espaciales de luz

Los moduladores espaciales de luz pueden dividirse en dos tipos: Espejos deformables y micro espejos digitales, donde los actuadores o membranas son controlados mediante campos eléctricos o magnéticos [19]. En el presente trabajo hablaremos solamente de los micro espejos digitales con aplicación en microscopía como pupilas de fase o amplitud para obtener superresolución, donde en nuestro caso se utilizó un SLM de cristal líquido sobre silicio (LCOS) Figura 3-6. Estructura de un Cristal Líquido sobre Silicio (LCOS) [22] en modulación únicamente de fase.

Los moduladores espaciales de luz de cristal líquido son pantallas que pueden influenciar dinámicamente la amplitud o fase de la luz que atraviesa o se refleja sobre ellos. Hoy en día el área total activa de un modulador mide aproximadamente 2cm^2 , a una resolución arriba de 2 millones de pixeles. La modulación de fase y amplitud es resultado de la birrefringencia del cristal líquido, donde la modulación de amplitud es originada por polarización y puede ser realizada utilizando un elemento que controle la polarización en combinación con el modulador (polarizador, placa de fase), en el caso de modulación de fase típicamente es solo en el rango de 2π [19] aunque existen moduladores con mayor cambio de fase [43]. Dependiendo del estado de polarización del campo incidente, siempre existirá una cierta combinación de ambas modulaciones, aunque también existen moduladores diseñados para modulación de solo fase, por ejemplo [43].



Figura 3-6. Estructura de un Cristal Líquido sobre Silicio (LCOS)

La polarización del campo reflejado por el LCOS es descrita por la matriz de Jones de la celda de cristal líquido [24]:

$$LC = \begin{bmatrix} a + ib & -c + id \\ c + id & a - ib \end{bmatrix} \quad (3.3)$$

Donde

$$a = \cos(\phi) \cos(\beta) + \frac{\phi}{\beta} \sin(\phi) \sin(\beta) \quad (3.4)$$

$$b = -\frac{\delta}{\beta} \cos(\phi) \sin(\beta) \quad (3.5)$$

$$c = \cos(\phi) \cos(\beta) + \frac{\phi}{\beta} \cos(\phi) \sin(\beta) \quad (3.6)$$

$$d = -\frac{\delta}{\beta} \sin(\phi) \sin(\beta) \quad (3.7)$$

Y

$$\beta = \sqrt{\delta^2 + \phi^2} \quad (3.8)$$

$$\delta = \frac{\pi d \Delta n}{\lambda} \quad (3.9)$$

Donde d es el espesor de la celda, ϕ es el ángulo de rotación del cristal líquido dependiente del voltaje según [23] para un cristal líquido descrito como:

$$\phi = \begin{cases} 0 & , V_{rms} \leq V_c \\ \frac{\pi}{2} - 2 \tan^{-1} \left\{ e^{-\frac{V_{rms} - V_c}{V_0}} \right\} & , V_{rms} > V_c \end{cases} \quad (3.10)$$

V_c es un voltaje de umbral al cual no hay rotación del cristal líquido y V_0 es el voltaje al cual ocurre el mayor ángulo de rotación.

y Δn es la birrefringencia de la celda:

$$\Delta n = n_c(\theta) - n_0 \quad (3.11)$$

Con n_0 el índice de refracción ordinario y n_c el índice extraordinario.

Por lo tanto el vector de Jones del campo reflejado puede obtenerse mediante la multiplicación matricial [24]:

$$J_R = LC(\phi, d\Delta n) M LC(\phi, d\Delta n) J \quad (3.12)$$

Donde M es la matriz de Jones de un espejo.

Y finalmente el cambio de fase se describe como:

$$\Delta\delta = \tan^{-1}\left(\frac{Im(J_R(e))}{Re(J_R(e))}\right) = \tan^{-1}\left(\frac{Im(J_R(o))}{Re(J_R(o))}\right) \quad (3.13)$$

Donde $J_R(e)$ y $J_R(o)$ son componentes ortogonales de J_R [24].

En la actualidad existen varios métodos para caracterizar la modulación de fase y amplitud de los SLM, todos basados en interferometría combinando diferentes técnicas, tales como franjas de Moiré [25], patrones de Fresnel [26] etc.

3.3 Función de Transferencia de un Sistema Óptico

Un buen indicador de la calidad de una imagen es la PSF (Point Spread Function), la cual es descrita como la irradiancia como función de la distancia radial. Entre más rápido se vuelva cero en distancia radial, mejor es la calidad de la imagen en términos de nitidez [20]. En la Figura 3-7. Concepto de PSF (Point Spread Function) se muestra una descripción de la formación de la PSF en un sistema óptico compuesto por una fuente puntual y una lente.

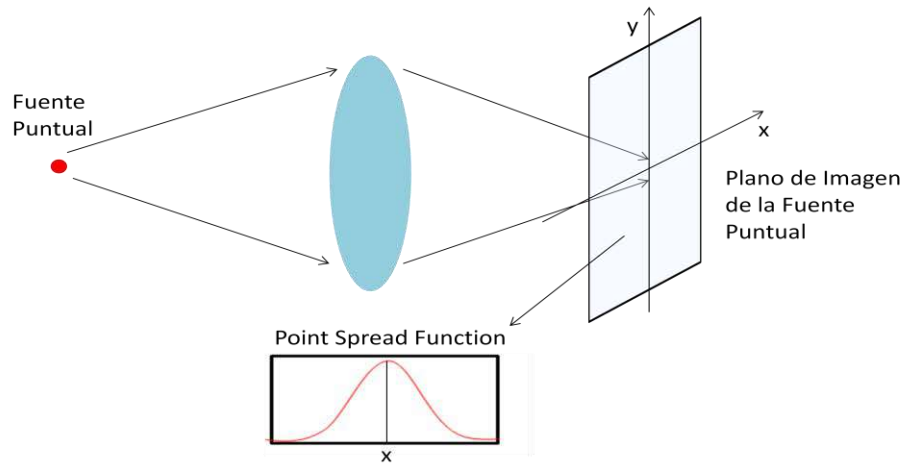


Figura 3-7. Concepto de PSF (Point Spread Function)

Matemáticamente se describe como:

$$h(x_2, y_2) = PSF = S\{\delta(x_1 - \xi, y_1 - \eta)\} \quad (3.14)$$

Donde $h(x_2, y_2)$ es la PSF y S es el operador del sistema que actúa sobre la función de impulso δ en el plano de entrada (ξ, η) . De modo que la salida $g_2(x_2, y_2)$ de un sistema con una entrada $g_1(\xi, \eta)$ es igual a [9]:

$$g_2(x_2, y_2) = \iint g_1(\xi, \eta)h(x_2, y_2; \xi, \eta)d\xi d\eta \quad (3.15)$$

Sin embargo existe un mejor indicador de calidad de los sistemas ópticos que describe la respuesta respecto a la frecuencia del sistema llamado Función de Transferencia y se calcula en base a la PSF.

3.3.1 Respuesta a la frecuencia de un sistema incoherente limitado por difracción

3.3.1.1 La función de Transferencia Óptica

Los sistemas que utilizan iluminación incoherente obedecen la integral de convolución [9]:

$$I_i(u, v) = k \iint |h(u - \xi, v - \eta)|^2 I_g(\xi, \eta) d\xi d\eta \quad (3.16)$$

Donde $I_g(\xi, \eta)$ es la intensidad de la entrada e $I_i(u, v)$ es la intensidad de salida del sistema. Y por los tanto si hacemos $G_g(fx, fy)$ y $G_i(fx, fy)$ el espectro normalizado de $I_g(\xi, \eta)$ e $I_i(u, v)$ respectivamente entonces:

$$G_i(fx, fy) = \mathcal{H}(fx, fy) G_g(fx, fy) \quad (3.17)$$

Donde $\mathcal{H}(fx, fy)$ es la función de transferencia óptica y es igual al espectro normalizado de $|h(u, v)|^2$. Y la MTF (Función de transferencia de Modulación) definida como $|\mathcal{H}(fx, fy)|$ es la respuesta a la frecuencia del sistema óptico [9].

3.3.2 Respuesta a la frecuencia de un sistema Coherente Limitado por Difracción

3.3.2.1 La Función de transferencia de Amplitud

Un sistema óptico coherente tiene como salida en el plano de frecuencias:

$$G_i(fx, fy) = H(fx, fy) G_g(fx, fy) \quad (3.18)$$

Donde $H(fx, fy)$ es la función de transferencia de amplitud y es igual al espectro de $h(u, v)$.

Para relacionar más directamente H a las características físicas de un sistema óptico, de acuerdo a la Figura 3-7. Concepto de PSF (Point Spread Function) podemos decir que $h(u, v)$ es de hecho un patrón de difracción de Fraunhofer que puede ser representado por la transformada de Fourier (escalada por la distancia focal) de la pupila del sistema [9]:

$$H(fx, fy) = \mathcal{F} \left\{ \frac{A}{\lambda z_i} \iint P(x, y) e^{-\frac{2i\pi}{\lambda z_i} [ux+uy]} dx dy \right\} \quad (3.19)$$

Con $P(x, y)$ la función de pupila y z_i siendo la distancia focal de la lente tenemos que:

$$H(fx, fy) = P(\lambda z_i fx, \lambda z_i fy) \quad (3.20)$$

Finalmente obtenemos una correspondencia directa entre la función de pupila y la función de transferencia del sistema. Esto quiere decir que la función de pupila modula directamente la respuesta de amplitud en función de las frecuencias que contiene la imagen formada por el sistema óptico coherente.

3.4 Pupilas Superresolutoras

3.4.1 Pupilas anulares

De acuerdo a [10] en 1841 G. B. Airy propuso por primera vez utilizar pupilas superresolutoras. Las pupilas propuestas por G. B. Airy fueron de forma anular o anillo. Tal como se muestra en la Figura 3-8. Pupila Anular las pupilas anulares consisten en bloquear el centro de la pupila circular, dejando pasar el campo solamente por un anillo delgado. En 1872 Lord Rayleigh demostró que la PSF de una pupila anular podía ser descrita por una función Bessel.

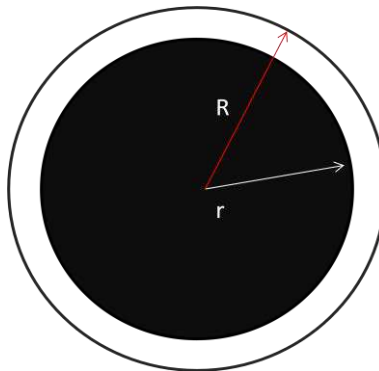


Figura 3-8. Pupila Anular $0 < (\eta=(r/R)) < 1$.

Las pupilas anulares tienen la característica de mejorar la respuesta a la frecuencia para las frecuencias más altas, es decir modifican la MTF de manera que se obtiene mejor contraste en las

frecuencias más cercanas al límite de difracción respecto a las frecuencias menores. Esta mejora está directamente relacionada con la relación entre el radio interior y radio exterior de la pupila; $\eta=r/R$ (de la Figura 3-8. Pupila Anular $0 < (\eta=r/R) < 1.$). En la Figura 3-9. MTF de pupilas anulares variando la relación $\eta=r/R$. se muestra el comportamiento de la MTF cuando partimos de una pupila circular completa ($\eta=0$) hasta una relación de pupila anular con $\eta=4/5$.

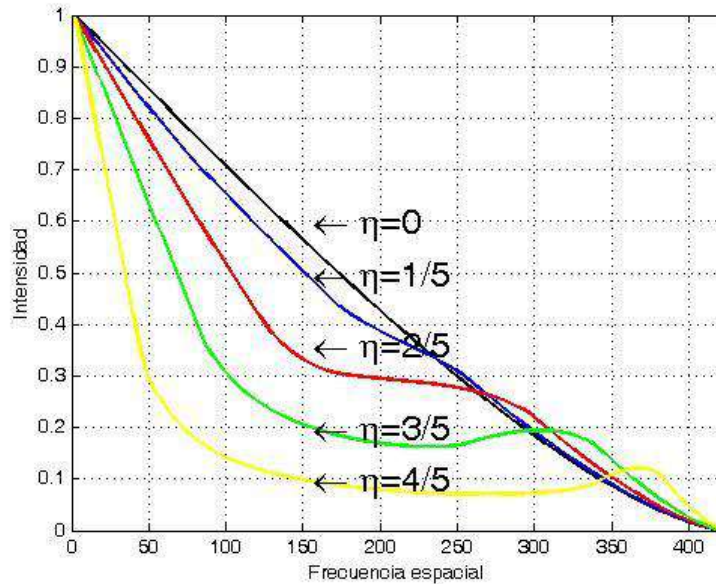


Figura 3-9. MTF de pupilas anulares variando la relación $\eta=r/R$.

El comportamiento de la gráfica muestra que mientras η se acerca más a 1, la respuesta en función de las frecuencias mejora cada vez más para las frecuencias más altas. Esto indica que la resolución del sistema mejora para las frecuencias más altas. El análisis de la función de transferencia de las pupilas anulares fue realizado por Edward L. O'Neill [21] en 1956.

3.4.2 Pupilas de Toraldo Di Francia basadas en la teoría de antenas de S. A. Schelkunoff

En 1952 Toraldo Di Francia propuso un nuevo tipo de pupilas superresolutoras basadas en la teoría de super ganancia en antenas de radiofrecuencia. La teoría de súper ganancia en antenas fue desarrollada por Schelkunoff [27] e implementada en óptica por Toraldo Di Francia [7]. La teoría de súper ganancia en antenas está basada en ajustar los elementos de una antena tal que los conos de silencio de la radiación estén equiespaciados en el rango de la variable compleja elemental que describe la radiación. Esto último se explica a continuación:

La amplitud radiada por una antena tipo End-Fire de n elementos puede ser descrita como:

$$f(\theta) = A_0 + A_1 e^{i\varphi} + A_2 e^{2i\varphi} \dots + A_{n-1} e^{(n-1)i\varphi} = A_0 + A_1 z + A_2 z^2 \dots + A_{n-1} z^{(n-1)} \quad (3.21)$$

Donde $A_0, A_1 \dots$ son amplitudes complejas, $z = e^{i\varphi}$ es un número complejo unitario [27] y $\varphi = \frac{2\pi l}{\lambda} \cos(\theta) - \vartheta$, con l siendo el espaciamiento entre elementos, θ el ángulo de dirección de la fuente y ϑ un retraso de fase progresivo.

El lado derecho de la ecuación anterior es una serie geométrica que equivale a [27]:

$$f(\theta) = \left| \frac{z^n - 1}{z - 1} \right| \quad (3.22)$$

Por lo tanto para $f(\theta)$ se pueden calcular n ceros (que son las raíces del numerador) los cuales representan conos de silencio en el campo irradiado, excepto para $z = 1$. Si z es un número complejo unitario entonces para el caso del lado derecho de la ecuación (3.21) cada multiplicación por $z = e^{i\varphi}$; es decir (z^n) representa un desplazamiento de arco de φ radianes en un círculo unitario. Entonces las n raíces dividen el círculo unitario en n partes iguales.

Como ejemplo en la Figura 3-10. Gráfica polar del patrón de radiación de una antena de 5 elementos. se muestra el patrón de radiación de una antena con $n = 5$ lo cual equivale a un factor de array (o ecuación de radiación de la antena):

$$f(\theta) = \left| \frac{\sin \frac{n\varphi}{2}}{n \sin \frac{\varphi}{2}} \right| ; n = 5 \quad (3.23)$$

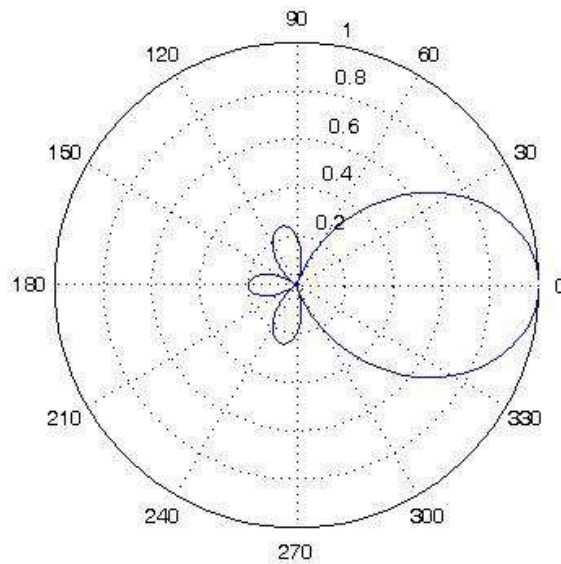


Figura 3-10. Gráfica polar del patrón de radiación de una antena de 5 elementos.

En la gráfica polar se pueden observar fácilmente los lugares geométricos de los ceros, aunque no estén señalados. Los ceros se encuentran en los conos donde no hay radiación. Por ejemplo uno de ellos se encuentra entre el ángulo 270° y 300° . Esto se puede observar mucho más fácilmente en la Figura 3-11. Gráfica del patrón de radiación de una antena de 5 elementos., la cual es la misma gráfica que la anterior pero en forma lineal.

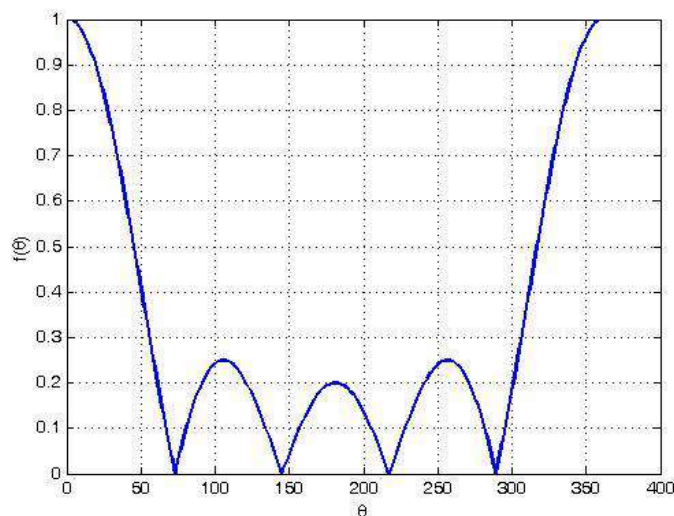


Figura 3-11. Gráfica del patrón de radiación de una antena de 5 elementos.

En la gráfica anterior se puede observar que efectivamente el patrón de radiación de una antena con n elementos cuenta con $n - 1$ ceros equiespaciados en todo el círculo unitario. Ahora como

$\varphi = \frac{2\pi l}{\lambda} \cos(\theta) - \vartheta$ es un número real y $|z| = 1$, entonces mientras θ incrementa z se mueve en dirección de las manecillas del reloj. Cuando $\theta = 0$, $\varphi = \frac{2\pi l}{\lambda} - \vartheta$ y cuando $\theta = 180$, $\varphi = -\frac{2\pi l}{\lambda} - \vartheta$. Por lo tanto el rango de φ descrito por z es:

$$\varphi = \frac{4\pi l}{\lambda} \tag{3.24}$$

Cuando la separación l es $\lambda/2$ el rango de z es 2π y de este modo z describe una vuelta completa al círculo unitario. De este modo si la separación entre elementos en la antena es menor que $\lambda/2$ entonces z describe solo un arco del círculo, tal como se muestra en la Figura 3-12. Rango de z para $l = \lambda/4$. De igual manera si $l > \lambda/2$ el rango será mayor que 2π y z describirá más de una vuelta.

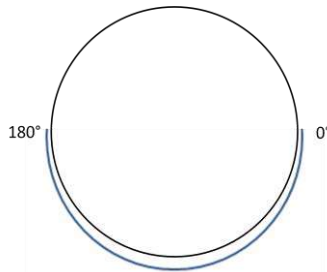


Figura 3-12. Rango de z para $l = \lambda/4$

Sin embargo, aunque el rango de z sea menor a 2π los $n - 1$ ceros pueden estar distribuidos por todo el círculo unitario, tal como en la Figura 3-13. a) Ceros en el círculo unitario de una antena con 3 elementos y espaciado entre elementos de $l = \lambda/4$ donde se muestran los ceros $c1$ y $c2$ de una antena de 3 elementos con separación $l = \lambda/4$. Y el patrón de radiación de esta antena se muestra en la línea azul de la Figura 3-14. Comparación entre la radiación de una antena con sus ceros equiespaciados (roja) y una con sus ceros equiespaciados en el rango de z .

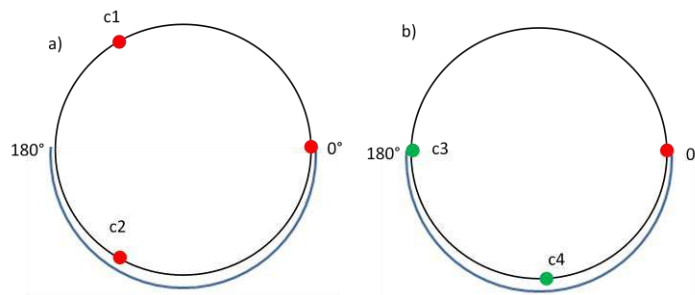


Figura 3-13. a) Ceros en el círculo unitario de una antena con 3 elementos y espaciado entre elementos de $l = \lambda/4$, b) ceros equiespaciados dentro del rango de z .

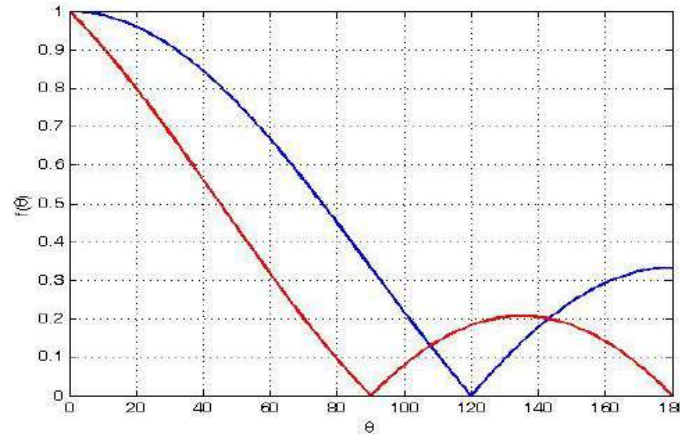


Figura 3-14. Comparación entre la radiación de una antena con sus ceros equiespaciados (roja) y una con sus ceros equiespaciados en el rango de z .

Evidente mente el cero que aparece en 120° provoca un lóbulo secundario en una dirección diferente a la del lóbulo principal y por lo tanto mucha parte de la radiación no está en la dirección principal. Esto empeora la ganancia de la antena. Pero si cambiamos de posición los ceros, de tal modo que se encuentren dentro del rango de z como en la Figura 3-13. a) Cerros en el círculo unitario de una antena con 3 elementos y espaciado entre elementos de $l = \lambda/4$, b) cerros equiespaciados dentro del rango de z ., esta situación se puede mejorar. El patrón de radiación con los cerros en el rango de z se muestra en la línea roja de la Figura 3-14. Comparación entre la radiación de una antena con sus ceros equiespaciados (roja) y una con sus ceros equiespaciados en el rango de z .. Comparando la gráfica azul con la roja, se puede observar que el lóbulo secundario es ahora menos intenso respecto al lóbulo principal de la gráfica azul, esto quiere decir que la ganancia de la antena mejoró.

Toraldo Di Francia demostró que algo muy similar a esto puede realizarse para el caso de un punto focal formado por una abertura con múltiples anillos obstruyendo la pupila de la lente. Para el caso de un sistema óptico la reducción de amplitud de los lóbulos secundarios en la antena equivale a la reducción de los anillos concéntricos al disco de Airy, y el cambio de la posición de los cerros en una antena equivale a un diámetro de disco de Airy más pequeño. Esto se puede observar en la Figura 3-14. Comparación entre la radiación de una antena con sus ceros equiespaciados (roja) y una con sus ceros equiespaciados en el rango de z . si pensamos en las gráficas (roja y azul) como si fuesen un medio perfil de un disco de Airy.

Antes de que Toraldo Di Francia desarrollara esta teoría las pupilas superresolutoras eran las de tipo anillo (como en la primera sección de este capítulo). Estas pupilas tenían la propiedad de disminuir el diámetro del disco de Airy a consecuencia de que los anillos concéntricos eran más intensos.

El camino para resolver este problema fue que partiendo de una pupila de anillo con diámetro D el punto focal es descrito por:

$$A(x) = J_0(x) \quad (3.25)$$

Con $x = \frac{\pi D \sin(\theta)}{\lambda}$. Donde el disco central del punto focal es más pequeño que el de la pupila sin obstruir: Figura 3-15. .

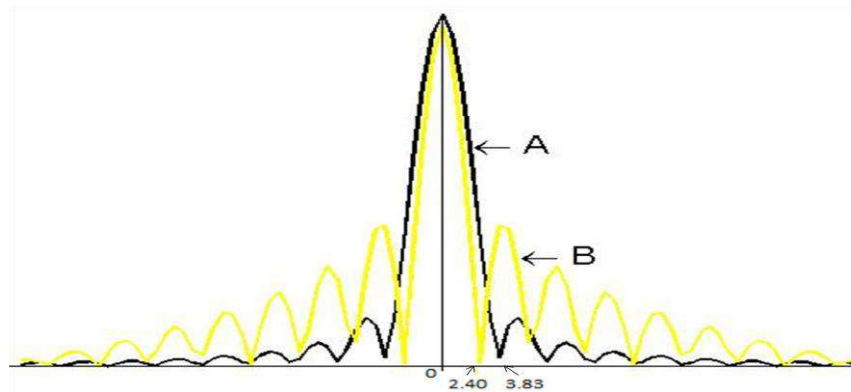


Figura 3-15. PSF de una pupila libre (A) y PSF de una pupila anular (B).

Pero si colocamos dos anillos más a la pupila con $D/3$ y $2D/3$ obtenemos un punto focal descrito por [7]:

$$A(x) = A_1 J_0\left(\frac{1}{3}x\right) + A_2 J_0\left(\frac{2}{3}x\right) + A_3 J_0(x) \quad (3.26)$$

Donde los factores A_1 , A_2 y A_3 dependen de las dimensiones y la transparencia de cada anillo. Y si añadimos las condiciones $A(0) = 1$ y $A(x) = 0$ cuando $x = 2.40$ y $x = 3.83$, la ecuación (3.26) se convierte en un sistema de 3 ecuaciones y 3 incógnitas, donde las soluciones son: $A_1 = 0.95$, $A_2 = -1.77$ y $A_3 = 1.82$. En la Figura 3-16. Comparación entre una pupila libre y las pupilas superresolutoras de un anillo y múltiples anillos. A) Pupila libre, B) Pupila anular de tamaño D , C) Pupila de Toraldo Di Francia con anillos de tamaño D , $2D/3$ y $D/3$. se observa una gráfica de la psf que se obtiene de esta última pupila y la comparación entre una pupila libre y una de un solo anillo.

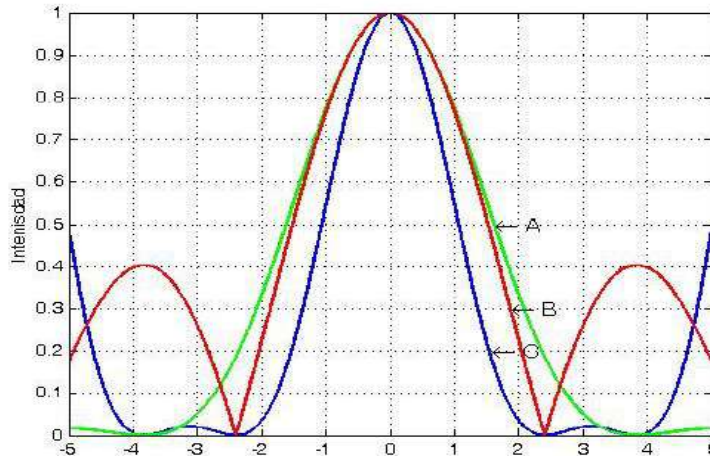


Figura 3-16. Comparación entre una pupila libre y las pupilas superresolutoras de un anillo y múltiples anillos. A) Pupila libre, B) Pupila anular de tamaño D , C) Pupila de Toraldo Di Francia con anillos de tamaño D , $2D/3$ y $D/3$.

La pupila de Toraldo Di Francia resulta en un primer lóbulo secundario mucho menos intenso que el lóbulo secundario de la pupila de un anillo solamente. Y comparando con la pupila libre, la pupila de Toraldo Di Francia posee la misma reducción del disco central que la de un anillo solamente.

En base a lo anterior se puede deducir que seleccionando $n - 1$ ceros; Es decir restricciones adecuadas tales como $A(x) = 0$ cuando $x = 2.40$ y $x = 3.83$, es posible reducir el diámetro del disco central y a su vez seleccionar una mayor cantidad de ceros en x para obtener una zona casi oscura alrededor del disco central tan grande como se desee [7]. Aunque cabe mencionar que el precio que se paga es la gran reducción de la intensidad del disco central en comparación con los anillos alrededor de este.

3.4.3 Otros tipos de pupilas

3.4.3.1 Vórtice

Las pupilas de vórtices son usadas extensamente para producir haces en forma de dona en aplicaciones de pinzas ópticas para manipular células, átomos y partículas [28]. En [19] son utilizados como filtros en el espacio de Fourier para obtener contraste de fase. Las pupilas de vórtice para producir puntos focales con superresolución fueron utilizadas por primera vez en el año 2010, mediante la combinación de una pupila de fase como vórtice y una pupila elíptica de amplitud [13], aunque en 2005 ya habían sido utilizados para mejorar la resolución en la detección de un exoplaneta eliminando la luz de su estrella madre [29].

Las pupilas de vórtice pueden ser generadas mediante:

$$V(\rho, \theta) = e^{im\theta} \quad (3.27)$$

Donde ρ y θ son coordenadas polares, radial y angular respectivamente y m es la carga topológica. En la Figura 3-17. Vórtice se muestra un vórtice con carga topológica $m=1$ y $m=2$.

A pesar de que en [13] se muestra cómo se puede obtener una reducción en el disco central del punto focal mediante una pupila de vórtice de fase combinada con una pupila elíptica de amplitud, no existe reporte hasta la fecha de que estas pupilas hayan sido utilizadas para la adquisición de imágenes.

Sin embargo los vórtices sí han sido utilizados en una técnica llamada microscopía STED (Stimulated Emission Depletion) para obtener superresolución [30]. De cualquier manera esta técnica está limitada a la microscopía de fluorescencia, tema que está fuera de los alcances del presente trabajo.

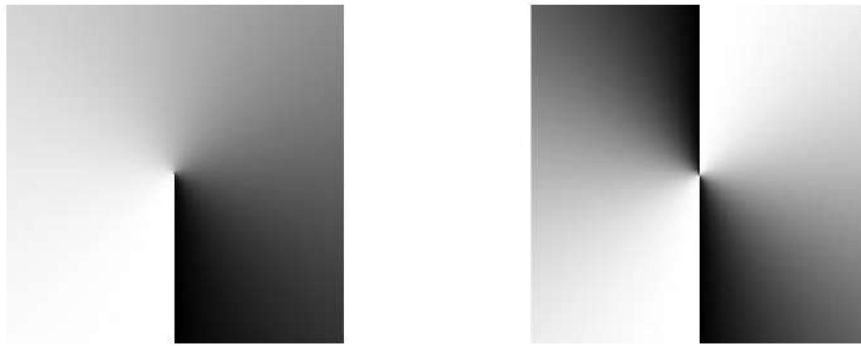


Figura 3-17. Vórtice con $m=1$ (izquierda) y $m=2$ (derecha)

3.4.3.2 Axicon

Los axicones son figuras de revolución tipo lentes con la propiedad de que una fuente puntual en su eje es convertida a un rango de puntos a lo largo de su eje. Por lo tanto los axicones no poseen una distancia focal definida [31]. La forma más simple y más usada es el axicon con forma de cono, como el de la Figura 3-18. Vista lateral de una lente (izquierda) y un axicon cónico (derecha), donde se muestra también la vista lateral de una lente a modo de comparación. Los axicones en forma de cono tienen algunas propiedades interesantes. Por ejemplo, se puede pensar en un axicon como una lente que posee tanta aberración de coma que el campo angular utilizable es muy reducido. Un axicon tiene una distancia focal que se extiende desde cero hasta el máximo y

podría decirse que tiene una sobre-corrección de aberración esférica igual a su distancia focal [31].

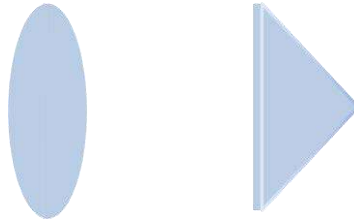


Figura 3-18. Vista lateral de una lente (izquierda) y un axicon cónico (derecha).

En la Figura 3-19. Trazo de rayos de un axicon dividido en un conjunto de anillos. se muestra como funciona un axicon. Se puede notar que cada rayo de la fuente puntual pasa a través del eje óptico, y esto sucede para cada sección A, B, C, D. Debajo del diagrama se muestran las secciones en las que se divide el axicon transversalmente y a la derecha se muestran las secciones de rayos A', B', C', D' proyectadas sobre una pantalla. Se puede observar que la sección C ilumina un solo punto C' en la pantalla, por lo tanto el punto C' es mucho más intenso que los anillos A', B' y D'. De esta manera un axicon genera una "línea focal" en lugar de un "punto focal" como en una lente común.

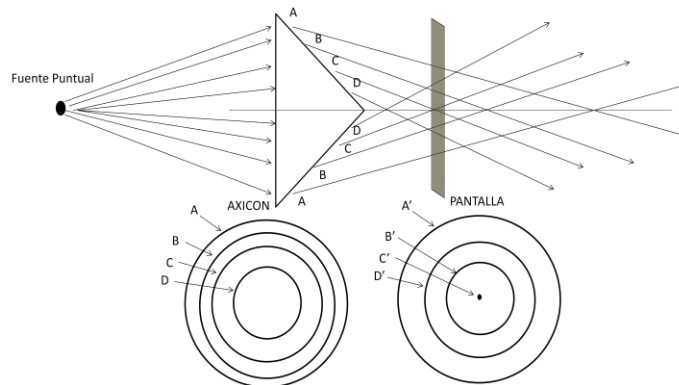


Figura 3-19. Trazo de rayos de un axicon dividido en un conjunto de anillos.

Otra propiedad que poseen los Axicones es la generación de haces adifraccionales o haces libres de difracción. El concepto de haces adifraccionales o haces cuyo perfil de intensidad es invariante con la propagación fue introducido por primera vez por Durnin en 1987 [34]. A pesar de el término "adifraccional" estos haces pueden ser descritos por la teoría de difracción.

Aparte de un haz infinitamente plano, la forma más simple de un haz adifraccional son los haces Bessel con amplitud proporcional a $J_n(\rho_0 r)e^{in\theta}$ donde r y θ es la coordenada radial y acimutal

respectivamente y ρ_0 es una constante considerada como la frecuencia espacial con unidades de 2π por unidad de longitud [32].

El primer experimento (Durnin 1987) [34] para demostrar haces adifraccionales consistió en una abertura tipo anillo, (tal como las pupilas anulares) colocada detrás de una lente. Luz colimada de longitud de onda λ incidía sobre la abertura anular colocada a la distancia focal de la lente. Idealmente cada punto de la abertura actúa como una fuente puntual la cual es transformada a una onda plana por la lente. Es fácil observar que este conjunto de ondas planas tiene vectores de onda contenidos en la superficie de un cono, que de hecho Durnin demostró que esto puede ser considerado como característico de un haz Bessel J_0 . En la referencia [34] se demostró que el haz generado por este arreglo es invariante con la propagación es decir; Adifraccional.

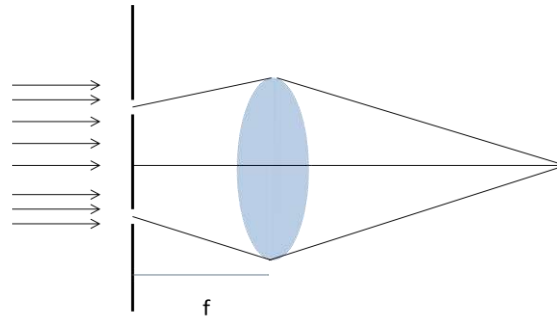


Figura 3-20. El primer experimento en demostrar haces adifraccionales.

Aunque mucho antes que Durnin, en 1962 ya se había encontrado que los axicones podían formar haces invariantes con la propagación y que además eran haces Bessel el término “adifraccional” fue introducido por Durnin, ver [34,35].

Los haces Bessel generados por axicones fueron descubiertos por Fujiwara en 1962 [35] mediante el análisis de la propagación de una fuente puntual iluminando un axicon en modo reflexión. El esquema se muestra en la Figura 3-21. Notación para el cálculo de la imagen en el plano $(\xi, \eta; z)$ formada por un axicon en reflexión..

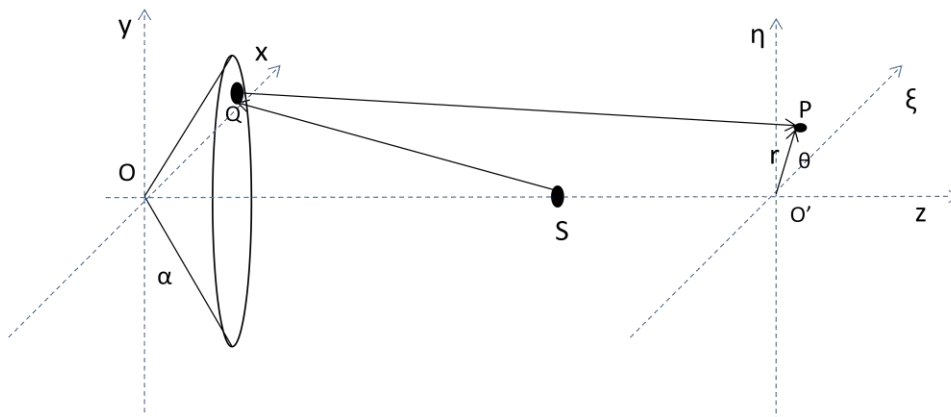


Figura 3-21. Notación para el cálculo de la imagen en el plano $(\xi, \eta; z)$ formada por un axicon en reflexión.

El sistema de coordenadas (x, y, z) es centrado en el vértice del cono en O de manera que z coincide con el eje del axicon. El diámetro del cono es $2\rho_0$ y el ángulo entre el cono y el plano (x, y) es α . La distancia del origen O a la fuente puntual S es l y la distancia de S a O' es l' . El cálculo se realizó de acuerdo a la formula de Kirchoff:

$$u_p = \frac{ik}{2\pi} \iint \frac{e^{-ik(SQ+QP)}}{SQ \cdot QP} d\Sigma \quad (3.28)$$

Donde u_p es la amplitud compleja del campo en el punto $p(\xi, \eta)$, $d\Sigma$ es el elemento de superficie del cono ubicado alrededor de Q y $k = 2\pi/\lambda$. Y la amplitud resultante es [35]:

$$u_p = 2ike^{-ik\psi_1} \frac{\alpha(\lambda l l')^{\frac{1}{2}}}{(l+l')^{\frac{3}{2}}} J_0\left(\frac{2k\alpha l r}{l+l'}\right) \quad (3.29)$$

Y la intensidad en $p(\xi, \eta)$ es:

$$I_p = |u_p|^2 = C \frac{\alpha^2}{\lambda} \frac{l l'}{(l+l')^3} J_0^2\left(\frac{2k\alpha l r}{l+l'}\right) \quad (3.30)$$

De manera que se puede observar que el patrón de difracción cambiaría de tamaño para variaciones de distancias l y l' a lo largo del eje, mas no cambiaría de forma [35]. También se demostró que el primer mínimo en el patrón de difracción está dado por:

$$r_0 = \frac{2.45}{k\lambda} = \frac{0.383\lambda}{\alpha} \quad (3.31)$$

4 Desarrollo

4.1 Introducción

Como ya se mencionó en el capítulo 1 la idea de probar la superresolución en campo lejano y sin escaneo de la muestra estaba basada en realizar la técnica de DIHM utilizando pupilas superresolutoras. El arreglo experimental propuesto para llevar a cabo este concepto fue:

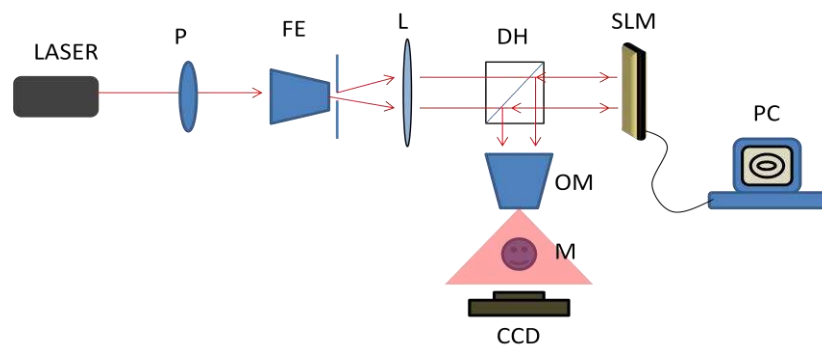


Figura 4-1. Arreglo experimental para probar la superresolución en DIHM. P-Polarizador Lineal, FE- Filtro espacial, L- Lente colimadora, DH-Divisor de Haz, OM-Objetivo de Microscopio, M-Muestra.

La longitud de onda del láser es de $\lambda = 632\text{nm}$, el Modulador espacial de luz en modo reflexión es un modulador tipo cristal líquido sobre silicio marca Holoeye, de modulación de fase, modelo LCR 2500 de 1024×768 píxeles con una profundidad de 8 bits y tamaño de pixel de $19\mu\text{m}$. El SLM fue caracterizado por la M.C. C.Y. Calderón Hermosillo con el método de la referencia [25] de modo que en este arreglo fue utilizado con el máximo cambio de fase que equivale a un nivel de gris de $255 \approx 2\pi$. El objetivo de microscopio utilizado para adquirir los hologramas fue un objetivo de $\text{NA}=0.1$, corregido a infinito, marca Olympus.

Como se puede observar en la Figura 4-1. Arreglo experimental para probar la superresolución en DIHM. P-Polarizador Lineal, FE- Filtro espacial, L- Lente colimadora, DH-Divisor de Haz, OM-Objetivo de Microscopio, M-Muestra. el arreglo experimental consiste en hacer incidir un haz colimado sobre el SLM de modo que el campo reflejado sobre el divisor de haz (proveniente del SLM) incida aproximadamente colimado sobre el objetivo de microscopio. De modo que el objetivo de microscopio contiene la pupila desplegada en el SLM, y de esta manera el punto focal formado por el objetivo de microscopio sea el resultado de realizar la transformada de Fourier óptica de la pupila desplegada en el SLM.

Ahora bien sabemos que la transformada de Fourier óptica de la pupila circular es un patrón de descrito por una función de Bessel J_1^2 y el disco central es el disco de Airy. Es decir si en el SLM desplegamos una constante, tendremos este último resultado. Y una imagen formada por este patrón de difracción está dentro del límite de resolución que según Rayleigh es igual al radio del disco de Airy.

Por lo tanto si desplegamos una pupila superresolutora esperamos obtener un patrón de difracción que supera ese límite.

4.2 Modulación Compleja en un modulador de Fase.

Como se mencionó en la sección anterior, la modulación que es capaz de realizar el SLM es solamente de fase. Aunque este modulador también presenta cambios en amplitud, tales cambios son tan pequeños y tan no lineales que es prácticamente inútil como modulador de amplitud.

Sin embargo las pupilas superresolutoras pueden estar compuestas tanto de cambios de solamente fase, solamente amplitud o ambas (pupilas complejas). Por ejemplo un anillo es una pupila binaria de amplitud, ya que está formada de solamente dos valores de amplitud:

$$T(r) = \begin{cases} 0; & r < a \\ 1; & r > a \end{cases} \quad (4.1)$$

Una pupila compleja está descrita por una función de amplitud $M(u)$ y una función de fase $\phi(u)$ de la forma:

$$T(u) = M(u) e^{i\phi(u)} \quad (4.2)$$

Por lo tanto si $M(u) = \text{constante}$ entonces tenemos una pupila de solo fase. Y si $\phi(u)$ es constante entonces tenemos una pupila de solo amplitud.

Para obtener modulación compleja en el modulador de fase, se utilizó la técnica descrita por [36], en la que se utiliza el desarrollo de una serie de Fourier –Taylor que resulta como:

$$T(u) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} T_n(u) e^{in\phi(u)} \quad (4.3)$$

Donde los coeficientes T_n son:

$$T_n(u) = e^{i[n-M(u)]\pi} \frac{\sin\{\pi[n - M(u)]\}}{\pi[n - M(u)]} \quad (4.4)$$

De modo que la amplitud se encuentra modulada dentro del coeficiente T_n . Esta técnica funciona en el orden uno del patrón de difracción resultante de hacer la transformada de Fourier de la pupila, por lo tanto en realidad la amplitud se encuentra en el coeficiente T_1 . Esto quiere decir que la modulación de amplitud funciona solo en el primer orden de difracción.

4.3 Reducción de la PSF

La reducción de la PSF que forma el objetivo de microscopio utilizado para iluminar la muestra se comprobó mediante el siguiente arreglo:

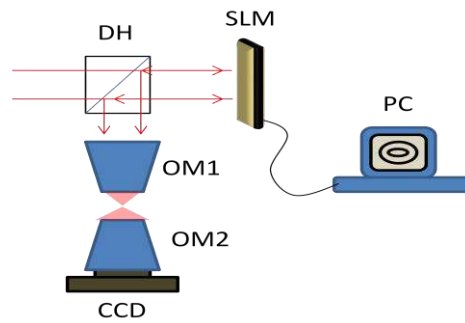


Figura 4-2. Arreglo utilizado para comprobar la reducción del disco central en el patrón de difracción (punto focal) de un objetivo de microscopio.

En el arreglo de la Figura 4-2. Arreglo utilizado para comprobar la reducción del disco central en el patrón de difracción (punto focal) de un objetivo de microscopio. se utilizó un objetivo de microscopio OM2 acoplado a la cámara CCD de una apertura numérica mayor que el objetivo de microscopio OM1 para observar el punto focal formado por el sistema experimental. La apertura numérica de OM1 fue de 0.10 (4x) y para OM2 de 0.40 (20x). Esto con el fin de que la resolución del observador (OM2) superara la resolución del punto focal formado por el sistema. Para los casos de modulación de solo fase o compleja se utilizó el mismo arreglo.

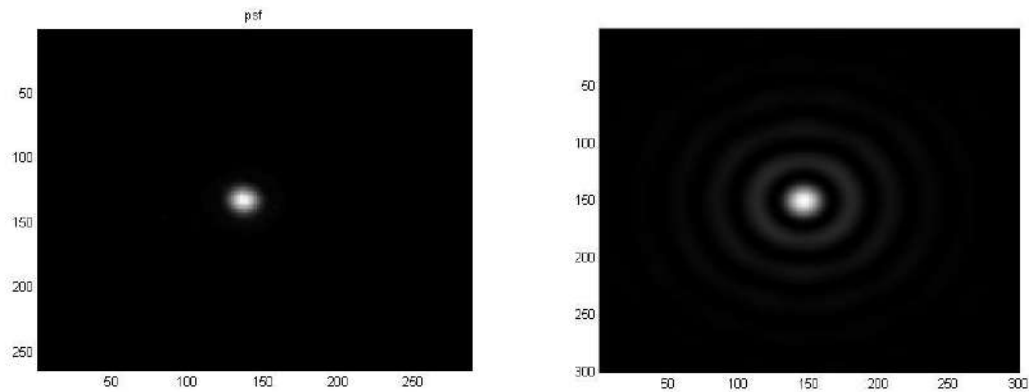


Figura 4-3. Simulación de la psf resultante de una pupila libre (izquierda) y una pupila de anillo con $D=3/4$ (derecha).

A modo de comparación en la Figura 4-3. Simulación de la psf resultante de una pupila libre (izquierda) y una pupila de anillo con $D=3/4$ (derecha). se muestra la psf simulada de una pupila de anillo y una pupila libre. Y para mostrar el diámetro del disco central de la psf simulada formada por la pupila de anillo en comparación con el disco de Airy de la pupila libre, se obtuvo la gráfica de un perfil que pasa justo por el punto máximo de cada una de las psf's. Esto último se muestra en la Figura 4-4. Perfil de la psf simulada de una pupila libre (azul) y de una pupila anular con $D=3/4$ (verde)..

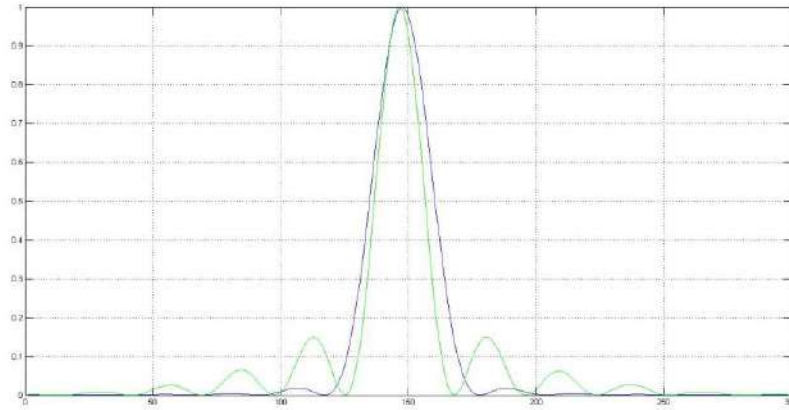


Figura 4-4. Perfil de la psf simulada de una pupila libre (azul) y de una pupila anular con $D=3/4$ (verde).

En la Figura anterior se puede observar claramente la reducción del diámetro del disco central de la PSF. Se obtuvo experimentalmente que la reducción es de 0.70 respecto al diámetro con la pupila libre. El resultado experimental realizado mediante el arreglo de la Figura 4-2. Arreglo utilizado para comprobar la reducción del disco central en el patrón de difracción (punto focal) de un objetivo de microscopio. se muestra en la Figura 4-5. PSF experimental de una pupila libre (izquierda) y una pupila de anillo (derecha). y en la Figura 4-6. Perfil de la PSF experimental de una pupila libre (azul) y una pupila anular con $D=3/4$ (verde). se muestra el perfil que comprueba la reducción del diámetro del disco central.

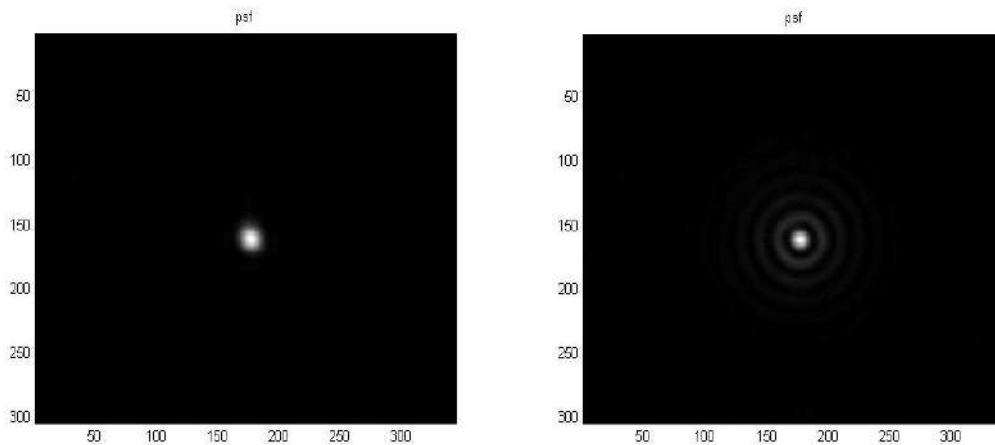


Figura 4-5. PSF experimental de una pupila libre (izquierda) y una pupila de anillo (derecha).

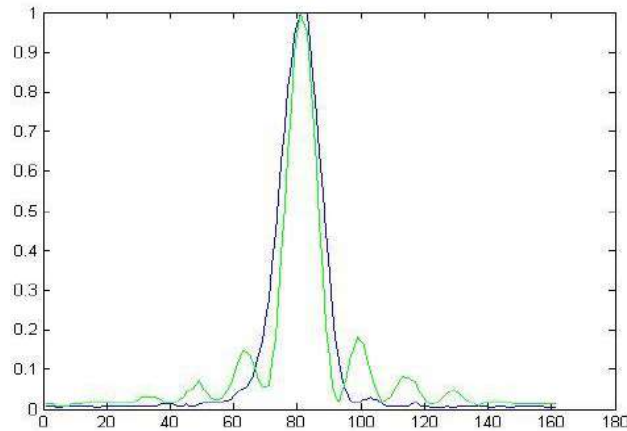


Figura 4-6. Perfil de la PSF experimental de una pupila libre (azul) y una pupila anular con $D=3/4$ (verde).

Para el caso experimental la reducción fue de 0.75, que es un resultado muy cercano a la simulación. Esta variación se debe a aberraciones en el sistema provocadas por una no perfecta alineación o bien aberración del mismo SLM la cual no se corrigió ni se tomó en cuenta. De la misma manera se comprobó la reducción de la PSF para pupilas de fase y pupilas complejas diseñadas por [37,38].

La primera es una pupila de fase [37] con reducción de 0.66. En la Figura 4-7. Pupila de fase con reducción de 0.66 (izquierda) se muestra el perfil de la PSF (verde) comparado con la PSF de la pupila libre (azul). Se saturó intencionalmente el disco central con el propósito de poder observar más claramente los anillos concéntricos y por ende el primer cero en el perfil. Con esta pupila se obtuvo una reducción experimental de 0.77.

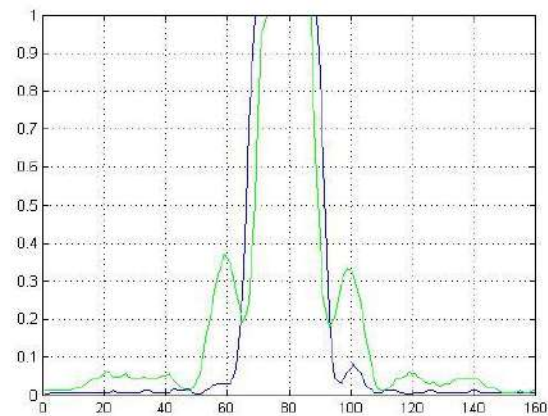
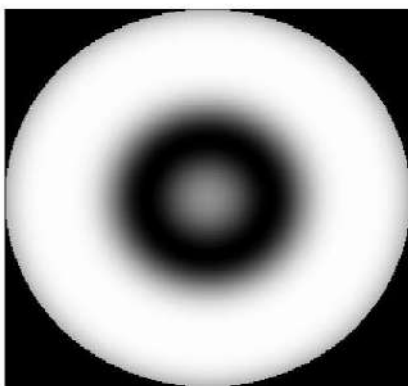


Figura 4-7. Pupila de fase con reducción de 0.66 (izquierda) y perfil de la PSF (derecha)(verde) experimental y PSF de una pupila libre (azul).

Para el caso de una pupila compleja es necesario que contenga una modulación tal que la transformada de Fourier esté formada de más de un solo punto focal. De acuerdo a la sección anterior la PSF correspondiente a la pupila compleja se encuentra en el orden 1 del patrón de difracción. En la Figura 4-8. Pupilas compleja (izquierda) con reducción de 0.65 y pupila libre (derecha), se muestra la pupila compleja [38] modulada en la función:

$$x' = atan2\left(\frac{\sin(x)}{\cos(x)}\right) \quad (4.5)$$

Donde *atan2* es la función del software MATLAB que realiza la operación $\tan^{-1}()$ pero asigna los ángulos resultantes en el rango $(-\pi, \pi)$ en lugar de $(-\pi/2, \pi/2)$. Para esta pupila se utilizó una modulación de 50 franjas en total.

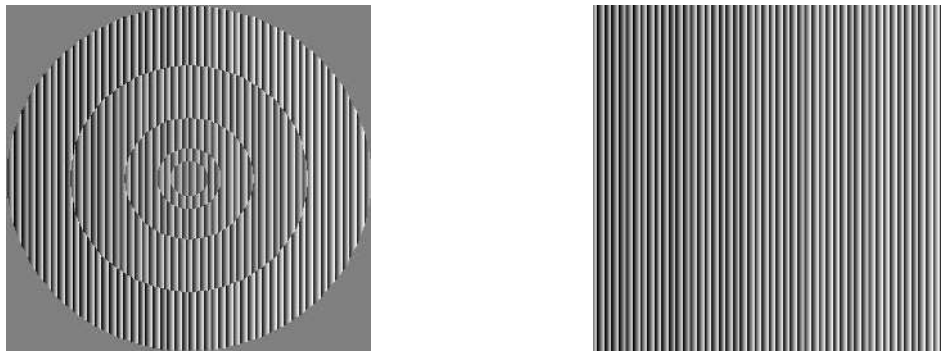


Figura 4-8. Pupila compleja (izquierda) con reducción de 0.65 y pupila libre (derecha).

En la Figura 4-9. PSF experimental (izquierda) y su correspondiente perfil (derecha) (verde) y perfil de la PSF de la pupila libre modulada (azul), se muestra la PSF experimental y su correspondiente perfil, en donde el disco central fue saturado intencionalmente con el fin de realizar la medición del diámetro del disco central.

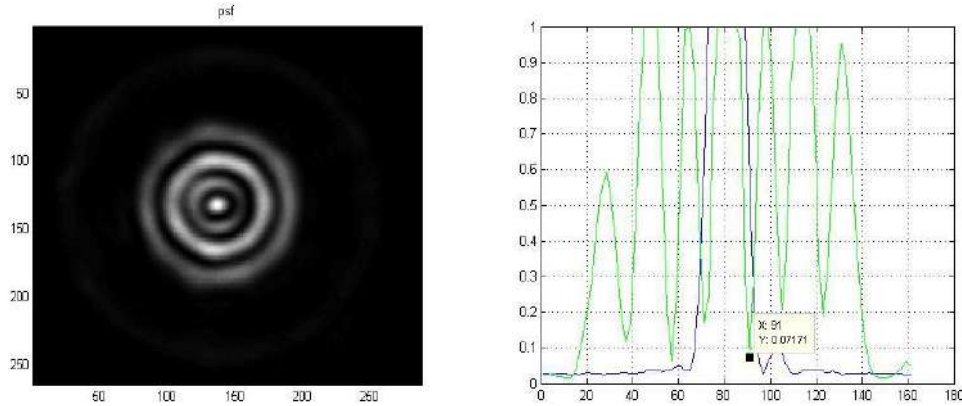


Figura 4-9. PSF experimental (izquierda) y su correspondiente perfil (derecha) (verde) y perfil de la PSF de la pupila libre modulada (azul).

Para esta pupila se obtuvo una reducción de 0.62.

4.4 Pruebas de DIHM con pupilas superresolutoras

Una vez que se obtuvo la reducción del disco central de la PSF se probó tomar imágenes de DIHM con y sin pupilas superresolutoras para comparar las imágenes reconstruidas. La muestra utilizada es una fibra óptica sin recubrimiento, donde el objetivo fue reconstruir imágenes del núcleo de la fibra. La reconstrucción se llevó a cabo mediante la propagación por espectro angular y las distancias entre la muestra, la fuente puntual y el CCD fueron ajustadas de la siguiente manera:

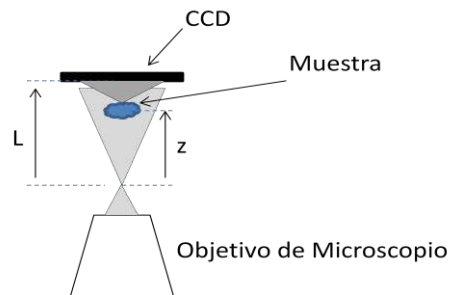


Figura 4-10. Distancias utilizadas en la adquisición de los hologramas.

Como podemos observar en la Figura 4-10 la muestra se colocó muy cercana al CCD por lo tanto la reconstrucción utilizada fue el espectro angular. La razón de esto es que pensamos que de esta manera se pueden reducir los parámetros de los que depende la resolución en la técnica de DIHM. En el capítulo de Microscopía Holográfica se mencionó que la NA depende tanto como de la anchura W del sensor y de la distancia D de la fuente puntual al sensor. Sin embargo esto es válido en el caso de que el ángulo del campo supere el ángulo del CCD medido desde la fuente puntual con referencia al eje óptico. Por lo tanto si colocamos el CCD tan cerca de la fuente puntual tal que toda el área del CCD esté iluminada aproximadamente por completo por el campo,

la NA se reduce a la NA del objetivo de microscopio. Y por lo tanto la resolución ahora se puede expresar como el límite de resolución de Rayleigh. Aunque nos queda un parámetro más que es el tamaño de pixel ya que en un holograma pueden existir frecuencias mayores a la frecuencia de los pixeles (franjas de menor periodo que el tamaño de pixel). Sin embargo pensamos que de este modo la resolución está mucho mejor controlada, además de que de este modo la iluminación de la pupila cubre por completo el CCD y podríamos observar mejor los efectos de la pupila utilizada.

En la Figura 4-11 se muestra el holograma digital de una fibra óptica junto con la substracción del fondo, en esta última se puede observar el patrón de difracción generado por la fibra¹.

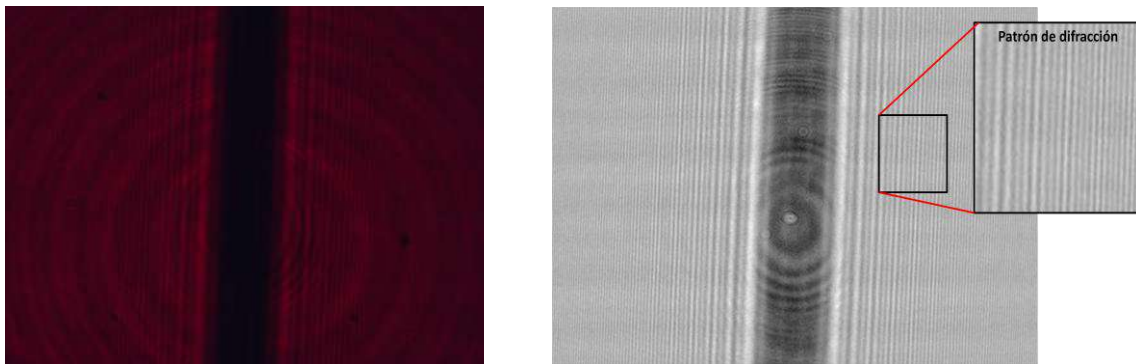


Figura 4-11. Iluminación de la muestra con una pupila libre. Imagen adquirida (izquierda) e imagen sin fondo (derecha)

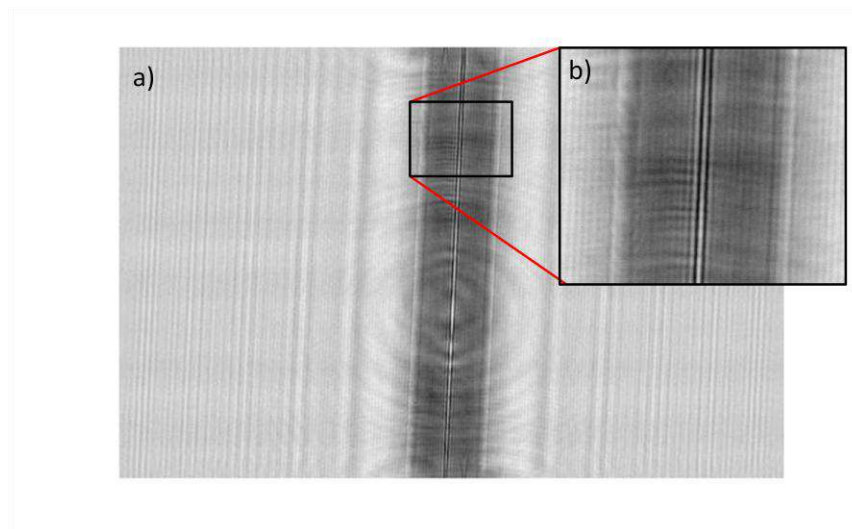


Figura 4-12. a) Reconstrucción con enfoque digital en el núcleo de la fibra, b) zoom.

¹ Aunque sabemos que no es solo un patrón de difracción, sino la interferencia del campo de referencia con la propagación del campo proveniente de la muestra. Sin embargo por simplicidad de texto lo llamaremos patrón de difracción.

En la Figura 4-12 se muestra la reconstrucción del holograma de la Figura 4-11 en la cual se puede apreciar claramente el núcleo de la fibra. Este es el único holograma en el cual se utilizó un objetivo de microscopio de $NA = 0.4$.

Después de probar la iluminación con pupila libre se adquirieron imágenes con pupilas superresolutoras utilizando un objetivo de microscopio de $NA = 0.1$ y colocando la cámara tan cerca del objetivo de microscopio tal que se observara el campo completo llenando el área de la cámara.

En la Figura 4-13 se muestra el holograma adquirido utilizando una pupila superresolutora con reducción de 0.68 de acuerdo a la referencia [37]. En la figura se observa que el patrón de difracción de la fibra está distorsionado ya sea por cambios de fase o por el hecho de que tal vez está pupila tiene la propiedad de crear un haz adifraccional. También se observa pérdida de información en el holograma debida a los cambios de amplitud que genera el campo proveniente del objetivo de microscopio al utilizar esta pupila superresolutora. Por lo tanto es imposible reconstruir la imagen de la fibra utilizando esta pupila. Además de lo anterior no se observa que este haz contenga algún cambio de magnificación o resolución al iluminar la muestra.

En la Figura 4-14 se muestra la misma prueba con otra pupila superresolutora [38] con reducción de 0.66 y se observa exactamente el mismo efecto. Además de no poder realizar la reconstrucción tampoco se observó ninguna modificación en las propiedades de magnificación o resolución del haz.

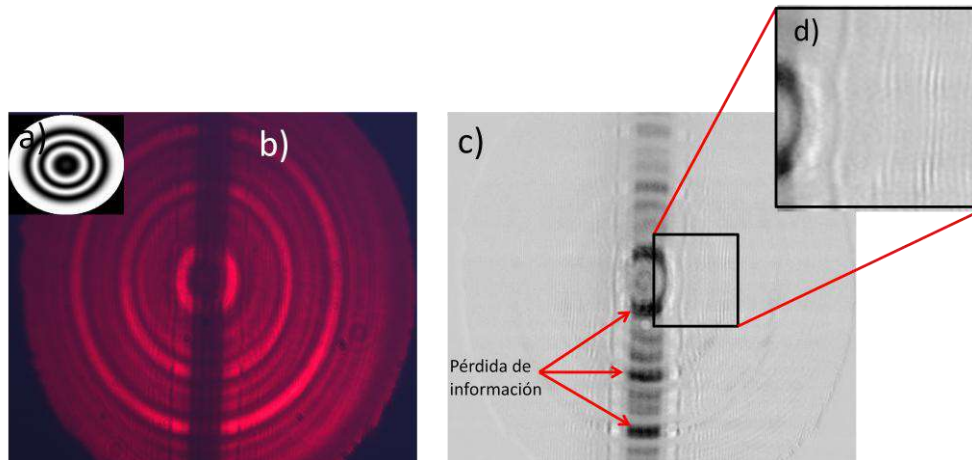


Figura 4-13. Holograma adquirido usando una pupila superresolutora con reducción de 0.67. a) Pupila utilizada, b) Holograma, c) Holograma sin fondo, d) Distorsión en el patrón de difracción

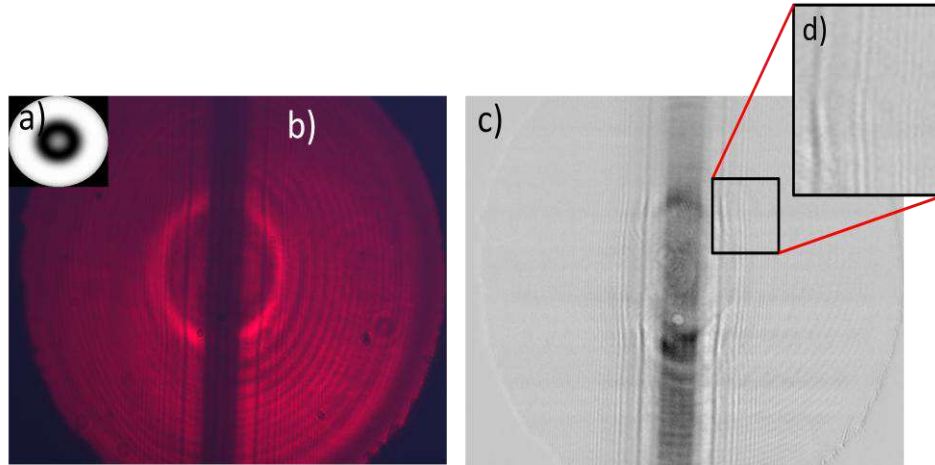


Figura 4-14. Holograma adquirido usando una pupila superresolutora con reducción de 0.66. a) Pupila utilizada, b) Holograma, c) Holograma sin fondo, d) Distorsión en el patrón de difracción

Para darnos una idea de lo ocurrido, se realizó la misma prueba con una pupila tipo axicón, que como ya se estudió en el capítulo anterior posee propiedades adifraccionales. Como un axicón es un elemento óptico que se puede clasificar dentro de un caso especial de una lente, este funciona gracias a cambios de índice de refracción en dirección radial, o bien por cambios de camino óptico en dirección radial para el caso del axicón en modo reflexión. Por lo tanto para el modulador esto equivale a realizar un cambio de fase que sobrepasa 2π . Pero en el modulador solo tenemos un rango de cambio de fase de 0 a 2π . Por lo tanto para resolver esto se desplegó una pupila con simetría de axicón envuelto radialmente como en la ecuación (4.5). Se puede pensar en esto como una lente de Fresnel. En la Figura 4-15 se muestra el holograma utilizando la pupila tipo axicón, donde se puede observar una total distorsión del patrón de difracción en el eje óptico del axicón al igual que en las otras dos pupilas superresolutoras de fase, pero visiblemente en mucho mayor grado.

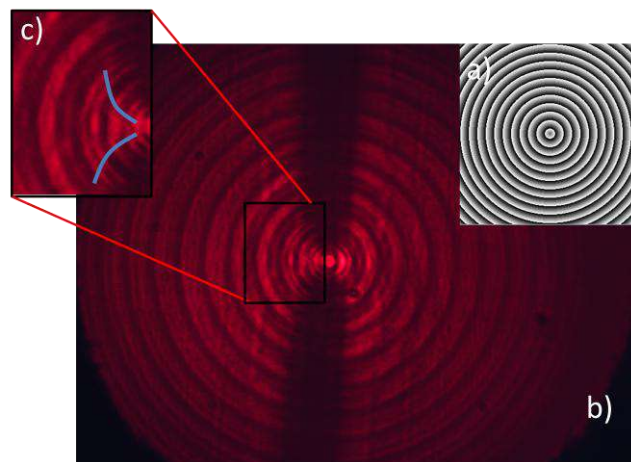


Figura 4-15. Iluminación de la fibra óptica desplegando una pupila tipo axicón. a) Pupila, b) Holograma, c) Distorsión en el patrón de difracción.

Después de verificar que las pupilas de fase no son de ninguna utilidad para el caso de DIHM a pesar de que reducen el disco de Airy, se comenzaron a realizar pruebas con las pupilas complejas con mayor reducción de la PSF.

La primera prueba se realizó con la pupila compleja con reducción de 0.65. El holograma se muestra en la Figura 4-16.

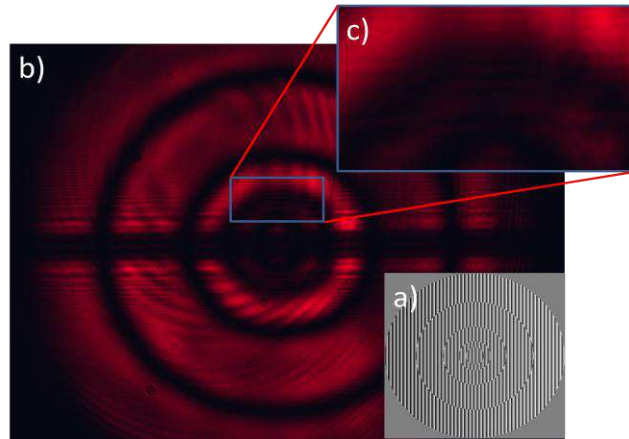


Figura 4-16. Holograma utilizando una pupila compleja con reducción de 0.66. a) Pupila utilizada, b) Holograma c) Patrón de difracción.

En el Holograma resultante utilizando la pupila compleja lo primero que se observa es que el patrón de difracción tiene una distorsión mínima. También se observa que la iluminación en campo cercano corresponde casi exactamente con la forma de la pupila; es decir si en la pupila hay una frontera entre un anillo y otro, en el campo de iluminación hay una frontera oscura que separa cada anillo. Por lo tanto la muestra es iluminada con un campo que tiene una forma muy parecida a la pupila. Esta ilumina con cambios de amplitud que causarían pérdida de información al igual que con las pupilas de fase, pero en dirección perpendicular a la fibra ilumina el patrón de difracción con cambios de amplitud; es decir se pierde el patrón de difracción solamente en donde el campo de iluminación es oscuro.

4.5 Primer análisis de la Función de Transferencia en DIHM

Podemos suponer que al difractarse el campo al incidir sobre la muestra el patrón de difracción representa los detalles de mayor a menor escala de la fibra. Es decir que la frecuencia de las franjas formadas por el patrón de difracción representa las frecuencias espaciales de los bordes de la muestra. Si observamos la Figura 4-11 claramente se observa que las franjas del patrón de difracción aumentan de frecuencia conforme más se alejan del centro de la muestra en dirección perpendicular a la fibra.

Como una analogía podemos pensar en que la muestra es una suma de rejillas de difracción de fase. Esto equivale matemáticamente a decir que una función $f(x)$ puede ser representada por una serie de Fourier:

$$f(x) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos nx + b_n \sin nx) \quad (4.6)$$

Con

$$a_n = \frac{1}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} f(x) \cos nx \, dx \quad \text{y} \quad b_n = \frac{1}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} f(x) \sin nx \, dx \quad (4.7)$$

Y que cada rejilla de difracción que compone la muestra, difracta la luz de acuerdo a la ecuación de difracción de una rejilla:

$$\theta_m = \sin^{-1} \left(\frac{m\lambda}{d} \right) \quad (4.8)$$

Donde θ es el ángulo con el que se difracta el orden m y d es el espaciamiento entre dos aberturas de la rejilla. Por lo tanto θ depende directamente de la frecuencia espacial $1/d$ de la rejilla.

Esto explica porqué las franjas de difracción en la Figura 4-11 son de mayor frecuencia al alejarse de la muestra en dirección perpendicular a la fibra. Suponiendo esto, ahora sabemos que las franjas más alejadas representan los detalles de mayor frecuencia espacial; es decir los detalles más finos de la muestra. Esto nos recuerda a la función de transferencia donde una gráfica muestra de mayor a menor la amplitud las frecuencias que es capaz de resolver una determinada PSF.

Tal como era para el caso de la función de transferencia de una pupila de anillo mostrada en el capítulo anterior la pregunta es: ¿podemos modificar la función de transferencia en DIHM con una pupila superresolutora? La respuesta es tal vez sí. Ya que al analizar el Holograma de la Figura 4-16 observamos que las franjas de difracción están moduladas por la pupila. Por lo tanto se modificó la amplitud de las frecuencias que componen el holograma mediante una pupila superresolutora.

Dado esto se realizó el análisis de la función de transferencia de la pupila compleja utilizada en el holograma de la Figura 4-16. La función de transferencia fue calculada de la PSF experimental y simulada de la pupila compleja para iluminación incoherente y se muestra en la Figura 4-17.

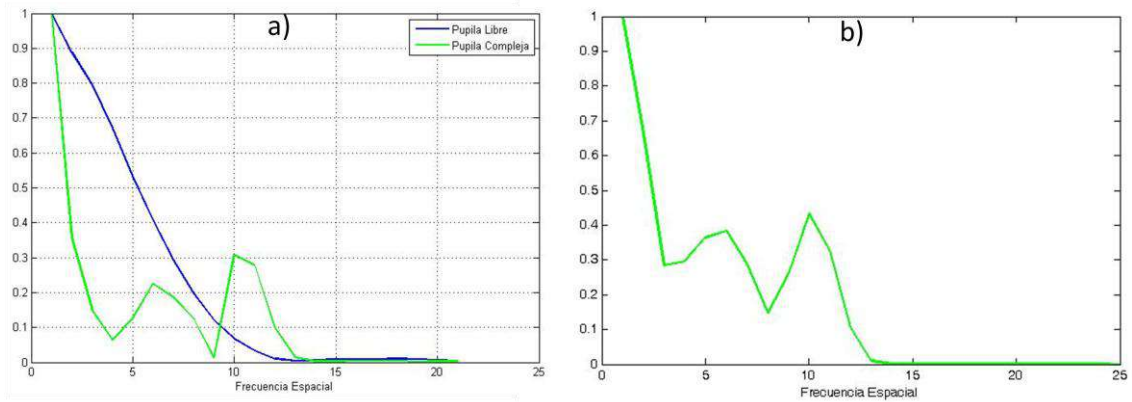


Figura 4-17. Función de Transferencia de Modulación calculada a partir de la PSF de la pupila superresolutora compleja (verde) y con fines de comparación de la pupila libre (azul). a) Experimental. b) Simulación.

Como se puede observar la pupila compleja causa un aumento de amplitud para las frecuencias mayores y con una oscilación en las frecuencias centrales. Es algo muy parecido a la modulación de las franjas de difracción que la pupila compleja causa en el holograma. Esto indica que para el caso del holograma la superresolución se podría cumplir al realizar esta modulación sobre las franjas de difracción, pero con la gran desventaja de no poder reconstruirlo. Al menos con esta pupila.

En base a lo anterior: 1) La pupila compleja modula el patrón de difracción, al parecer porque tiene componente de amplitud y 2) Es razonable pensar que en el caso de DIHM la Función de Transferencia es en sí el patrón de difracción mismo del holograma. Entonces suponemos que podemos realizar superresolución en DIHM mediante una pupila con ciertas características que no hemos encontrado y que no poseen las pupilas anteriormente utilizadas.

Sin embargo el resultado más cercano a esto es una pupila compleja, y esto nos hace pensar ahora en la modulación de amplitud.

Por esto último se realizó una prueba con una pupila tipo anillo la cual es de amplitud y además iluminaría solamente las franjas más lejanas del centro de la fibra (que son las franjas de mayor frecuencia), véase la Figura 4-18.

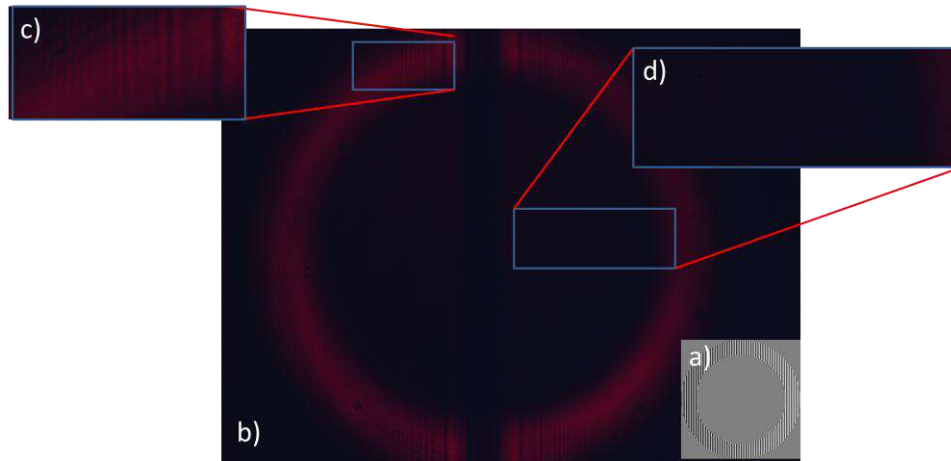


Figura 4-18. Holograma resultante de utilizar una pupila tipo anillo de amplitud. a) Pupila utilizada, b) Holograma, c) Patrón de difracción, d) El patrón de difracción ahora no aparece cerca del centro ni en dirección perpendicular desde el centro de la fibra.

En la Figura 4-18 se observa algo muy lógico: 1) El patrón de difracción que aparecía cerca del centro de la imagen en el caso de las pupilas anteriores ya no aparece debido a que la pupila de anillo causa que no se ilumine en absoluto el centro, 2) El patrón de difracción solo se observa cerca del área iluminada y solo cerca de la muestra y 3) Por supuesto que este holograma no se puede reconstruir porque cantidad de franjas es muy pobre y esto sin contar el hecho de que prácticamente no se adquirió información de la muestra en absoluto, véase la Figura 4-19.

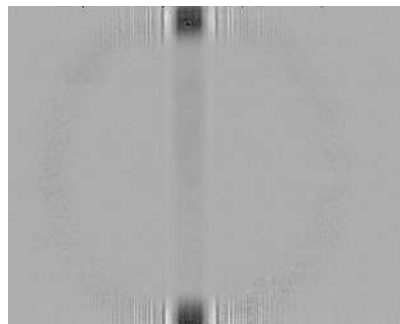


Figura 4-19. Substracción del fondo en el holograma de la Figura 4-18.

En la Figura 4-19 se observa que la pérdida de información es debido a la no iluminación de la muestra.

Ahora, si vemos la Figura 4-13 y Figura 4-14 se observa que la pérdida de información al extraerle el fondo al holograma se debe a los anillos más luminosos. De cualquier manera (ya sea en las pupilas de fase o amplitud) podemos deducir que la pérdida de información de la muestra se debe a cambios de contraste en la iluminación. Dicho de otra manera se debe a que las pupilas utilizadas anteriormente aportan más frecuencias en el holograma; frecuencias que no aportan información sobre la muestra y por lo tanto no son de utilidad.

Entonces es preciso realizarse la siguiente pregunta: ¿Existe una pupila superresolutora que no aporte más frecuencias a la iluminación y que además module las frecuencias del holograma?

4.6 Pupila tipo axicón de amplitud.

La única forma que se encontró para resolver el problema mencionado anteriormente fue usar una pupila como la que se muestra en la Figura 4-20.

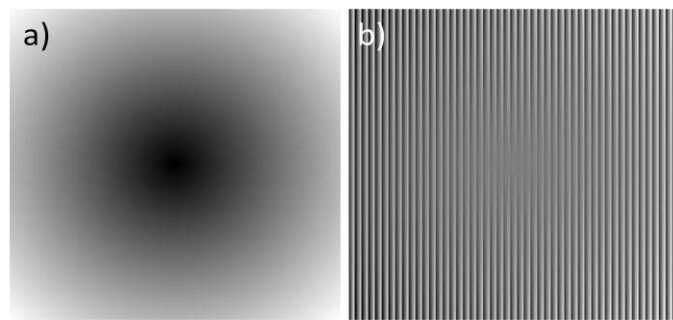


Figura 4-20. Axicón de amplitud. a) Idea de la pupila a utilizar, b) Pupila desplegada en el SLM de fase.

Sabiendo lo anterior la idea de utilizar un axicón de amplitud es clara. Un axicón de amplitud al poseer una pendiente constante (es una recta) y continua (no necesita ser envuelto en la función tangente como en el caso de axicón de fase) no introduciría más frecuencias en el holograma y modularía la amplitud de las franjas.

Ya que el centro del axicón se eligió como el área más oscura; al iluminar la muestra, las franjas de mayor frecuencia tendrían mayor amplitud que las de menor frecuencia ocasionando una mejora en la función de transferencia.

El perfil de la pupila de amplitud resultante es como el de la Figura 4-21, donde en la gráfica el cero en el eje x equivale al centro de la pupila.

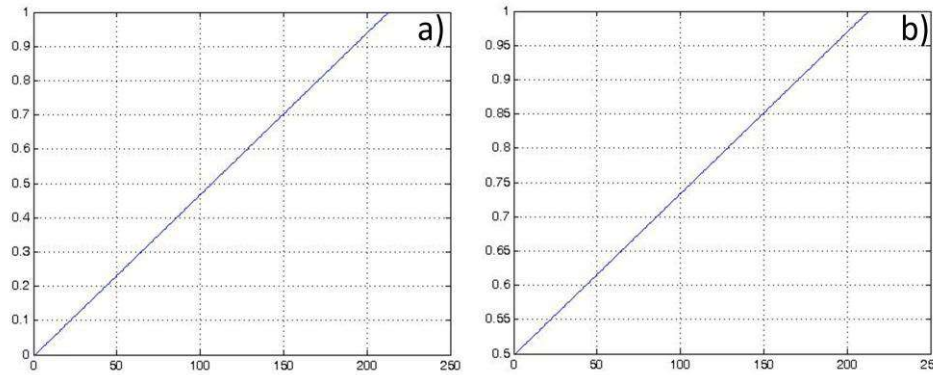


Figura 4-21. Medio perfil de la pupila tipo axicón de amplitud. a) Normalizado de 0 a 1, b) Normalizada de 0.5 a 1

Se utilizó la normalización de 0.5 a 1 debido al mismo problema que se presenta con la pupila tipo anillo: El centro no se iluminaría en absoluto si se utilizara la normalización de 0-1. La normalización de 0.5-1 equivale en nivel de gris a 128-255 (en el SLM de 8 bits) ocasionando que el centro (iluminado con un nivel de gris de 128) sí sea suficientemente iluminado como para generar el patrón de difracción en el holograma.

El resultado de utilizar esta pupila se muestra en la Figura 4-22. El resultado mostrado aquí es el esperado. Al modular el patrón de difracción con el axicón el resultado es que obtenemos mejor contraste en las frecuencias mayores de la muestra. Que en este caso el detalle más fino en la muestra es el núcleo de la fibra.

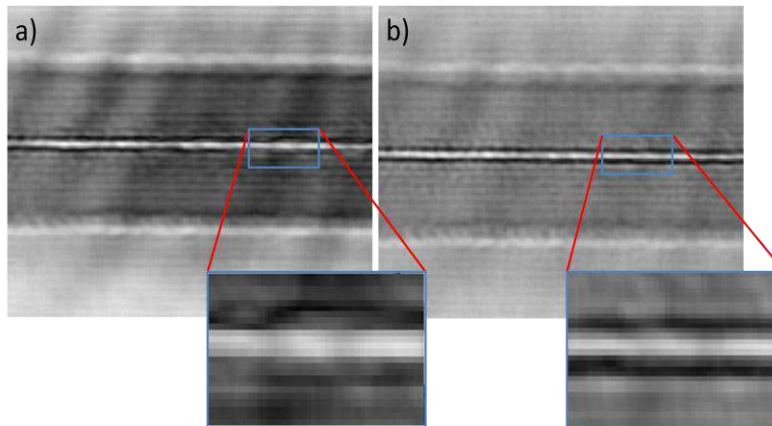


Figura 4-22. Reconstrucción del núcleo de la fibra. a) Utilizando una pupila libre. b) Utilizando la pupila tipo axicón de amplitud con normalización de 0.5-1.

Otra prueba realizada con iluminación parcialmente coherente se realizó mediante el arreglo de la Figura 4-23. Colocando un vidrio esmerilado en el camino del haz de iluminación se consigue reducir la coherencia del láser, véase [41]. El vidrio esmerilado se hace rotar a una velocidad tal que la cámara no sea capaz de detectar los cambios de intensidad. Esta prueba se realizó para

eliminar el patrón de interferencia que aparece en algunos de los hologramas mostrados anteriormente, como por ejemplo en la Figura 4-16 se observa un patrón de franjas circular centrado en el segundo anillo formado por la pupila. Este patrón de interferencia es debido a que la iluminación altamente coherente interfiere en el mismo vidrio que cubre el CCD de la cámara utilizada, y como la iluminación es en sí una onda esférica, el patrón de interferencia tiene forma circular. Por lo tanto una reducción de coherencia en la iluminación reduciría el contraste de este patrón.

En la Figura 4-24 se muestra el resultado de la reconstrucción del núcleo de la fibra utilizando iluminación parcialmente coherente. Se puede observar en el acercamiento un buen resultado aunque no se observa una gran diferencia entre las dos imágenes como en el caso de la iluminación coherente.

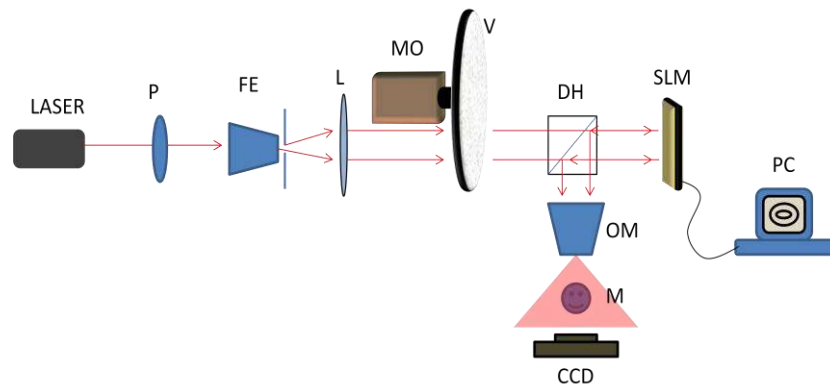


Figura 4-23. P-Polarizador Lineal, FE- Filtro espacial, L- Lente colimadora, DH-Divisor de Haz, OM-Objetivo de Microscopio, M-Muestra, MO-Motor, V- Vidrio esmerilado.

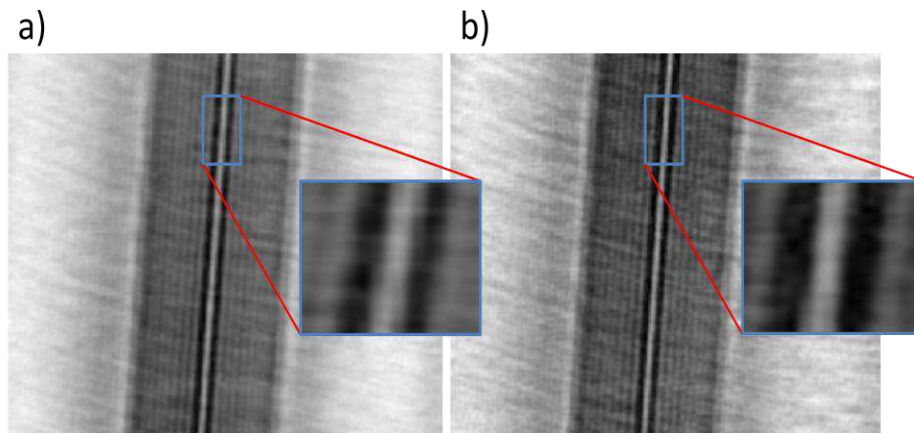


Figura 4-24. Reconstrucción del núcleo de la fibra con iluminación parcialmente incoherente. a) Utilizando una pupila libre. b) Utilizando la pupila tipo axicón de amplitud con normalización de 0.5-1.

4.7 Segundo Análisis de la función de transferencia en DIHM

En un perfil del holograma podemos ver cómo la modulación modifica la amplitud de las franjas del patrón de difracción al desplegar el axicón en el SLM. En la Figura 4-25 se muestra el perfil del holograma del cual se reconstruyó la Figura 4-22 que muestra la superresolución en DIHM. En la gráfica se puede observar como el axicón (verde) cambia la amplitud de las franjas de mayor frecuencia respecto a las franjas de menor frecuencia en comparación con el perfil desplegando la pupila libre (azul). Se sobreentiende que las franjas de mayor frecuencia en la gráfica son las que están alrededor del pixel número 900 en la gráfica y las de menor frecuencia son las que están alrededor del pixel número 300.

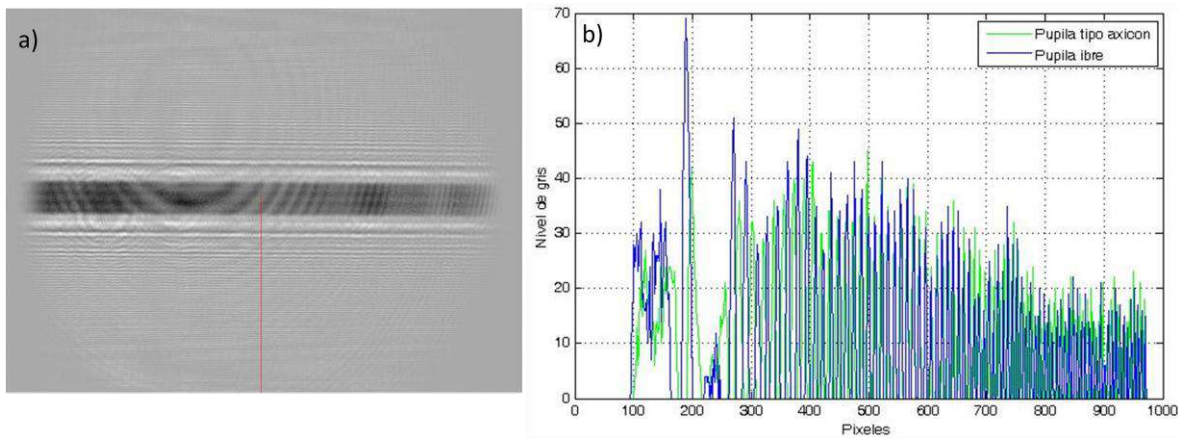


Figura 4-25. Análisis del holograma de la Figura 4-22. a) Holograma sin fondo, b) Perfil de la línea roja mostrada en a) utilizando una pupila libre y tipo axicón.

Por lo tanto al desplegar la pupila tipo axicón se obtiene algo similar a la función de transferencia resultante de las pupilas tipo anillo. Véase la sección 3.4. En la Figura 4-26 se muestra una representación exagerada del resultado obtenido al utilizar la pupila tipo axicón. De hecho podemos decir que la pupila tipo axicón de amplitud es similar a un anillo pero adaptada para que pueda funcionar en DIHM, de esta manera podemos decir que estamos utilizando una pupila aproximadamente de tipo anular.

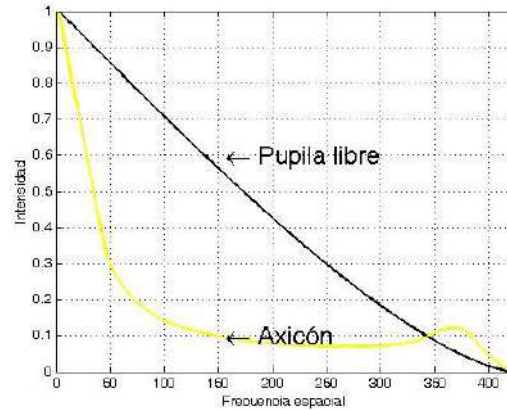


Figura 4-26. Representación del resultado supuesto en la función de transferencia utilizando la pupila tipo axicón.

4.8 Análisis de la pupila tipo axicón de amplitud

Aunque esta pupila fue diseñada de un modo heurístico, resulta que aparte de modificar la función de transferencia de una manera favorable, se comprobó que es de hecho una pupila superresolutora. Esta pupila superresolutora posee la propiedad de reducir el disco de Airy por 0.83 en el caso de la normalización de 0-1 y una reducción de 0.93 en el caso de la normalización 0.5-1. En la Figura 4-27 se muestran los perfiles de la PSF simulada de la pupila tipo axicón de amplitud en los casos de ambas normalizaciones.

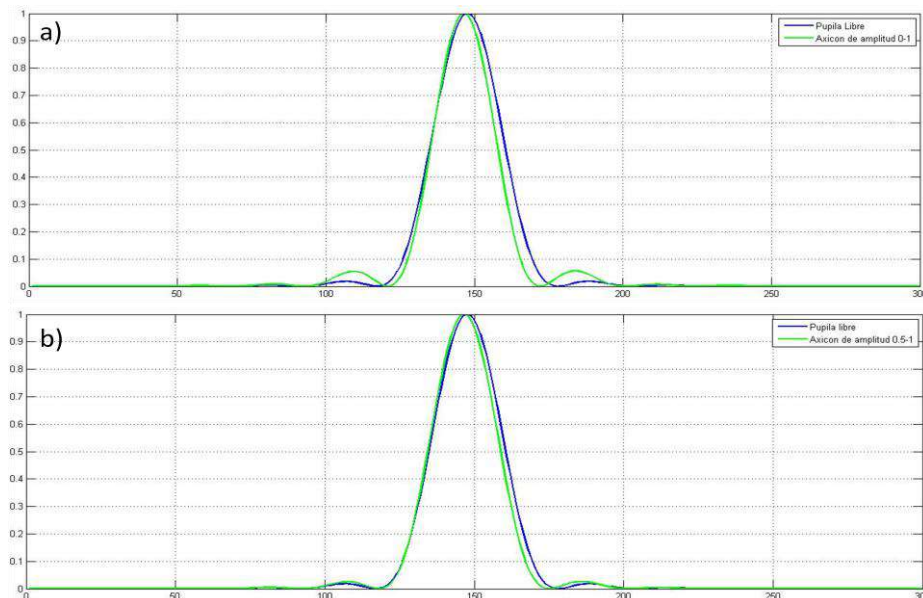


Figura 4-27. Simulación de la PSF de la pupila tipo axicón de amplitud. a) Normalización 0-1 y b) Normalización 0.5-1

El análisis de función de transferencia de amplitud no es necesario ya que su definición es el espectro de la PSF el cual resulta en la misma pupila. Sin embargo para el caso de la función de transferencia de modulación se realizó la simulación a partir de la PSF simulada de la figura anterior. La gráfica de la función de transferencia de modulación se muestra en la Figura 4-28.

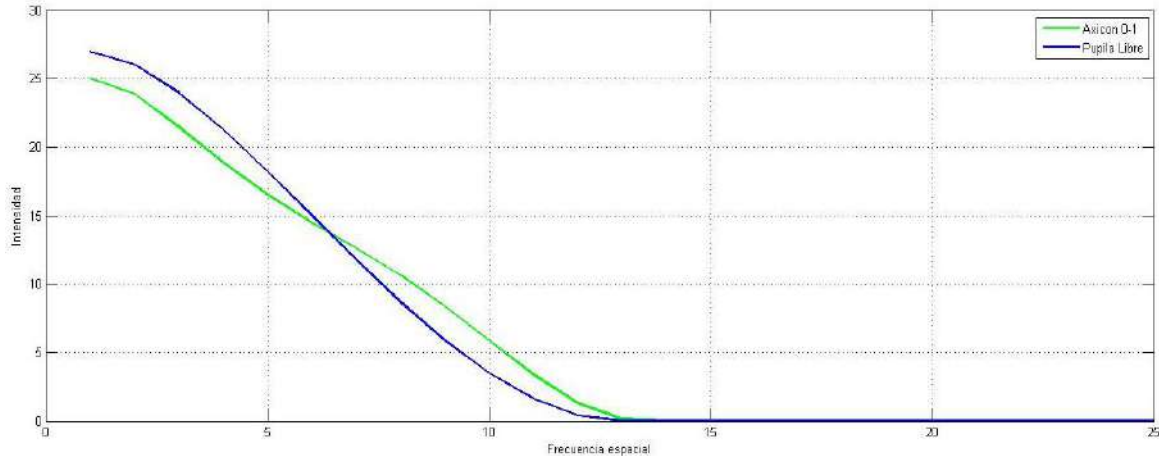


Figura 4-28. Función de transferencia de modulación obtenida de la simulación de la PSF de la pupila tipo axicón de amplitud con normalización 0-1.

En la figura anterior se observa que en la función de transferencia resulta un efecto similar al que se había supuesto anteriormente comparando el axicón de amplitud con una pupila anular. Por lo tanto, efectivamente la pupila tipo axicón de amplitud provoca mejor respuesta en las frecuencias mayores que en las menores en comparación con el resultado de la pupila libre (línea azul en la gráfica).

5. Análisis

5.1. Pupilas de Fase

En base a los resultados anteriores podemos decir que las pupilas de fase no son de ninguna utilidad para realizar superresolución en el caso específico de DIHM. La descripción del porqué se intenta explicar a partir de la propagación mediante la integral de Fraunhofer y la integral de Fresnel-Kirchhoff. Véase la Figura 5-1. En la figura se muestran los planos en los cuales la propagación del haz de iluminación cambia en términos de difracción. Sabemos que un punto focal formado por una lente es la transformada de Fourier óptica de la pupila de entrada, lo cual equivale a la integral de Fraunhofer aún aunque el campo se encuentre en la región de campo cercano [9]. Esto mismo suponemos para el punto focal propagado una distancia igual a la distancia focal de la lente, de manera que en esa distancia obtenemos la transformada inversa de Fourier óptica, y a partir de esa distancia suponemos la propagación por la integral de Fresnel-Kirchhoff hasta llegar a la muestra.

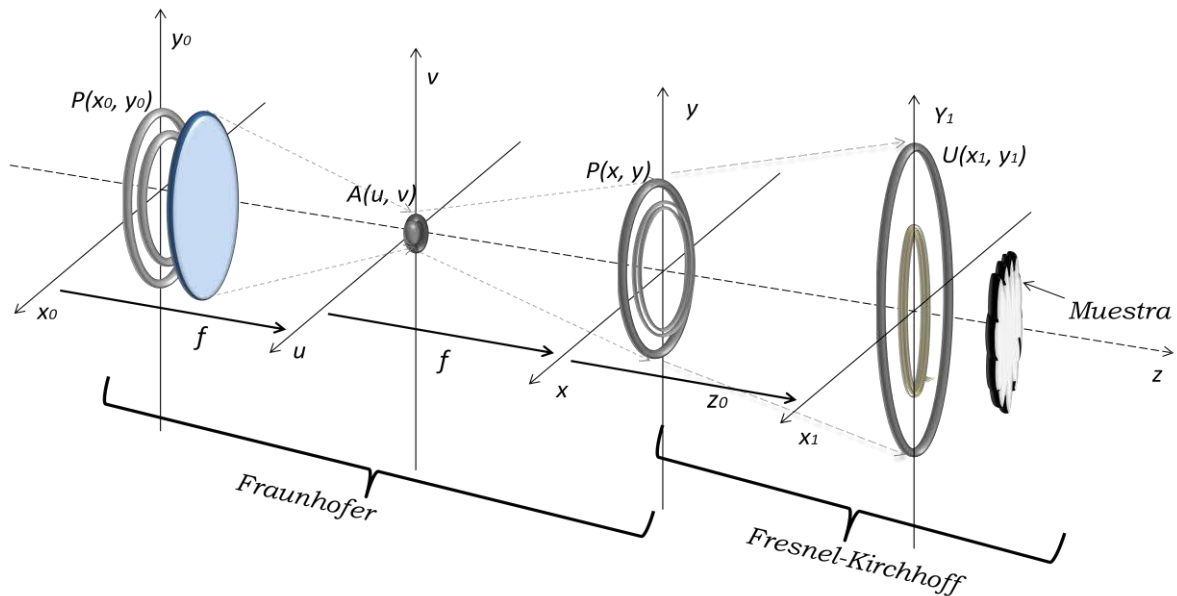


Figura 5-1. Propagación del campo en el arreglo de DIHM superresolutor.

En la figura anterior el punto focal es $A(u, v)$ y es igual a la integral de Fraunhofer:

$$A(u, v) = C1 \iint P(x_0, y_0) e^{-j\frac{2\pi}{\lambda f}(ux_0 + vy_0)} dx_0 dy_0 \quad (5.1)$$

Y el campo propagado después del punto focal lo suponemos como la transformada inversa:

$$P(x, y) = C2 \iint A(u, v) e^{j\frac{2\pi}{\lambda f}(ux+vy)} dudv \quad (5.2)$$

Después $P(x, y)$ es propagado una distancia z mediante la integral de Fresnel-Kirchhoff:

$$U(x_1, y_1) = C \iint P(x, y) e^{-j\frac{2\pi}{2\lambda z}[(x-\xi)^2+(y-\eta)^2]} d\xi d\eta \quad (5.3)$$

Como podemos observar en la ecuación anterior que una función $P(x, y)$ de amplitud resultaría en una propagación $U(x_1, y_1)$ de un campo aproximadamente esférico de fase $E(\xi, \eta) = e^{-j\frac{2\pi}{2\lambda z}[(x-\xi)^2+(y-\eta)^2]}$ difractado por una abertura $P(x, y)$.

Ahora si suponemos que la función $P(x, y)$ es de fase, es decir $P(x, y) = e^{M(x,y)}$ ahora $U(x_1, y_1)$ es igual a la integral de la multiplicación de $P(x, y)E(\xi, \eta) = e^{M(x,y)} e^{-j\frac{2\pi}{2\lambda z}[(x-\xi)^2+(y-\eta)^2]}$. Esto resultaría en: $P(x, y)E(\xi, \eta) = e^{-j\frac{2\pi}{2\lambda z}[(x-\xi)^2+(y-\eta)^2]+M(x,y)} = E'(\xi, \eta)$, es decir:

$$U(x_1, y_1) = C \iint e^{-j\frac{2\pi}{2\lambda z}[(x-\xi)^2+(y-\eta)^2]+M(x,y)} d\xi d\eta \quad (5.4)$$

Entonces la multiplicación de funciones $E'(\xi, \eta)$ en la integral ahora no es una onda aproximadamente esférica. Esta integral es la difracción del campo provocada por un obstáculo de fase igual a $e^{M(x,y)}$. Y la suposición que se hace en DIHM es que la muestra es iluminada con una onda esférica. Es por esto último que suponemos que las pupilas de fase crean distorsiones severas (no solo cambios de amplitud) en el patrón de difracción de los hologramas adquiridos.

5.2. Pupilas de Amplitud en el modulador de Fase

Partiendo de $P(x, y)$ en la Figura 5-1 al igual que en el caso de la pupila de fase el campo es propagado una distancia z mediante la integral de Fresnel-Kirchhoff, ecu. (5.3). Pero recordando que la constante es en realidad $C = \frac{e^{kjz}}{j\lambda z}$ en (5.3). Ahora, debido a las observaciones en los experimentos realizados, la modulación de amplitud no actúa como una abertura después de la transformada inversa de Fourier óptica. Es decir lo que no ocurre es:

$$U(x_1, y_1) = C \iint P(x, y) e^{-j\frac{2\pi}{2\lambda z}[(x-\xi)^2+(y-\eta)^2]} d\xi d\eta \quad (5.5)$$

Sino la pupila de amplitud se multiplica con la onda esférica $C = \frac{e^{kjz}}{j\lambda z}$ que emana del punto focal y por lo tanto:

$$U(x_1, y_1) = P(x, y) \frac{e^{kjz}}{j\lambda z} \iint e^{-j\frac{2\pi}{\lambda z}[(x-\xi)^2+(y-\eta)^2]} d\xi d\eta \quad (5.6)$$

Lo que ocurre en el arreglo es que al modular solo amplitud, la función de amplitud no cambia con la propagación del haz, al menos que exista un obstáculo (la muestra).

5.3. Iluminación coherente y parcialmente coherente

Como ya se mencionó antes la iluminación parcialmente coherente se obtuvo por medio de un vidrio esmerilado giratorio colocado en el camino óptico entre la lente colimadora y el SLM. La disminución de coherencia dio lugar a que el patrón de interferencia distorsionara la reconstrucción en menor medida que para el caso de iluminación coherente. Como bien sabemos ya la reconstrucción se basa en propagar el campo difractado numéricamente y si ese campo difractado contiene frecuencias adicionales entonces la reconstrucción resultará distorsionada. En la Figura 5-2 se muestra la reducción del patrón de interferencia provocado por la iluminación coherente.

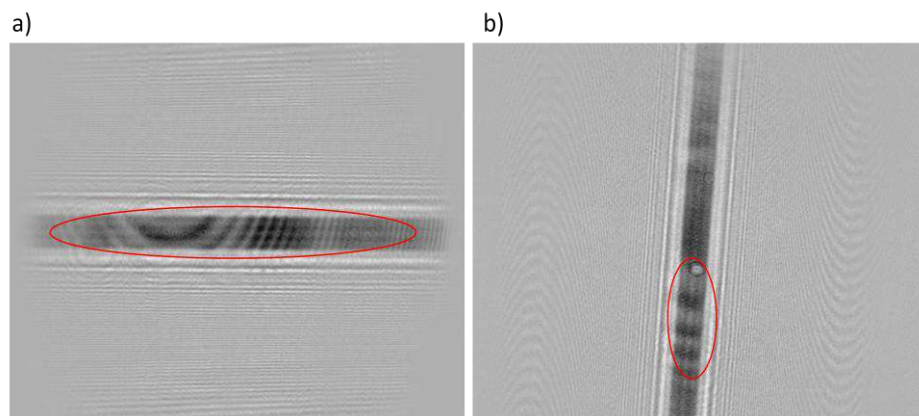


Figura 5-2. Ruido en los Hologramas de la fibra. a) Iluminación coherente, b) Iluminación parcialmente coherente

5.4. Superresolución de la pupila tipo axicón.

Como hemos visto, las pupilas superresolutoras provocan una modulación de la respuesta a las frecuencias en la función de transferencia. Sin embargo lo que se espera de las pupilas superresolutoras es que el límite de difracción sea superado. Es decir que la reducción del punto focal de lugar a un sistema que supere la frecuencia de corte. Esto quiere decir que en las gráficas de función de transferencia la curva llegue a ser cero en un punto más lejano del origen del eje de las frecuencias. Esto equivale a decir que el límite de resolución por ejemplo de Rayleigh:

$$r = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (5.7)$$

es superado. Solo que en el caso de la grafica de la función de transferencia el eje de las frecuencias muestra todas las frecuencias espaciales del sistema, de modo que si escribimos el criterio de Rayleigh como:

$$f_c = \frac{1}{r} = \frac{NA}{0.61\lambda} \quad (5.8)$$

ahora representa la frecuencia espacial de corte en la gráfica de la función de transferencia. Véase la Figura 5-3 donde se calculó la función de transferencia de modulación a partir de la autocorrelación de la función de amplitud, en esta se observa que la frecuencia de corte es la misma para una pupila libre que para la pupila superresolutora tipo axicón de amplitud. Y debemos señalar que este es el mismo caso para toda pupila superresolutora, véase [39].

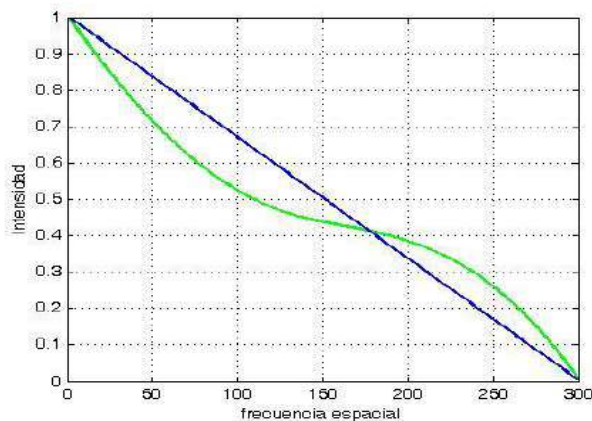


Figura 5-3. Función de Transferencia de Modulación de la pupila tipo axicón.

Por lo tanto lo desarrollado en el presente trabajo con la pupila tipo axicón de amplitud sí comprueba la superresolución en DIHM con pupilas superresolutoras, sin embargo esto no sobrepasa la frecuencia de corte del sistema, solamente modula la respuesta a la frecuencia de una manera favorable para las frecuencias más cercanas al límite de difracción.

Esta discusión sobre la frecuencia de corte en las pupilas superresolutoras ya ha sido estudiada y con anterioridad en la referencia [39], sin embargo en esta tesis se ha comprobado experimentalmente en un método holográfico. En la referencia [39] el conjunto de valores para los cuales la función de transferencia no es cero es llamado soporte de la función de transferencia, y una conclusión de los autores de [39] es que este soporte de la función de transferencia es invariante a la utilización de pupilas superresolutoras para una gran variedad de sistemas ópticos.

Otra de las conclusiones referencia [39] es que las pupilas superresolutoras desde un punto de vista de procesamiento de señales ocasionan una mejora en la SNR (razón señal ruido). Y es algo que de hecho lo podemos ver en nuestros resultados: Figura 5-4. En esta reconstrucción con iluminación coherente se observa como el axicón de amplitud provocó que el patrón de interferencia provocado por la coherencia disminuyera su contraste (ver círculos rojos en la figura). Este patrón disminuyó de intensidad respecto a todos los demás detalles de la imagen debido a que es de una frecuencia muy baja y por tanto el cambio en la función de transferencia provocó que su respuesta fuera menor.

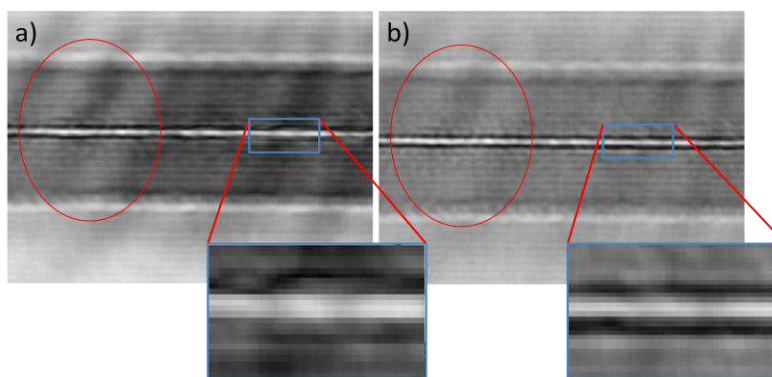


Figura 5-4. Reconstrucción del núcleo de la fibra con iluminación coherente. a) Pupila libre b) Con Axicón de amplitud

6. Conclusiones

Las pupilas superresolutoras disminuyen el disco central del patrón de difracción, sin embargo esto no es de utilidad si no se va a utilizar el punto focal en sí para la adquisición de imágenes (como en microscopía confocal). Para el caso de DIHM que es una técnica de microscopía de campo lejano y sin escaneo, las pupilas superresolutoras de fase provocan cambios de fase en la iluminación creando una iluminación no esférica, de modo que no permiten realizar la reconstrucción del holograma, al menos con los métodos que se conocen hasta ahora en DIHM. Para el caso de las pupilas de amplitud la reconstrucción falla debido a que se introducen más frecuencias en el holograma; Frecuencias que no aportan información útil y por lo tanto terminan aportando ruido. Por lo tanto una conclusión que podemos hacer es que para el caso de DIHM además de no cambiar la frecuencia de corte con una pupila superresolutora tampoco es posible modificar la función de transferencia de manera directa con cualquier pupila superresolutora.

La pupila tipo axicón de amplitud es una pupila superresolutora que sí es capaz de provocar una mejora en la función de transferencia en el caso de DIHM.

Esto nos indica que para el caso de DIHM un cambio favorable en la función de transferencia tal vez tiene que ser siempre provocado por una pupila superresolutora, y esto no se cumple de forma inversa.

Además de los resultados anteriores debemos mencionar que se desplegaron pupilas complejas y también de solo amplitud en un modulador de solo fase mediante el método de la referencia [44] basado en [36].

En el presente trabajo se describió la función de transferencia en DIHM y gracias a esto se logró comprobar la superresolución mediante pupilas superresolutoras en un método holográfico.

Probablemente la pupila superresolutora tipo axicón de amplitud pueda ser utilizada en un futuro para otros métodos holográficos en los que la función de transferencia funcione similar a como funciona en DIHM.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Garcia, W. Xu, S. Jericho, P. Klages, M. Jericho, H. Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy" *APPLIED OPTICS* Vol. 45, No. 5 (2006).
- [2] Ulf Schnars, W. Juptner, "Digital recording and numerical reconstruction of holograms" *Meas. Sci. Technol.* **13** R85 (2002).
- [3] T. Tishko, T. Dmitry, T. Vladimir (2011): *Holographic Microscopy of Phase Microscopic Objects: Theory and Practice*. World Scientific.
- [4] E. Leith, J. Upatnieks "Microscopy by Wavefront Reconstruction" *Journal of the Optical Society of America*, Vol. 55, No. 8 (1965).
- [5] P. Ferraro, A. Wax, Z. Zalevsky (2011), *Coherent Light Microscopy*. Springer.
- [6] A. Shiraki¹, Y. Taniguchi², T. Shimobaba, N. Masuda, T. Ito, "Handheld and low-cost digital holographic microscopy" *arXiv:1211.0336* (2012).
- [7] G. Toraldo Di Francia "Super-Gain Antennas and Optical Resolving Power", *Nuovo Cimento Suppl.* 9 (1952) 366.
- [8] G. R. Fowles (1975), *Introduction to Modern optics*. Dover Publications Inc.
- [9] Joseph W. Goodman (2005), *Introduction to Fourier Optics*. Roberts & Company.
- [10] Colin J. R. Sheppard and Amarjyoti Choudhury, "Annular pupils, radial polarization, and superresolution", *APPLIED OPTICS* 1 Vol. 43, No. 22, (2004).
- [11] Z. S. Hegedus, "Superresolving filters in confocally scanned imaging systems", *J. Opt. Soc. Am. A/Vol.* 3, No. 11, (1986).
- [12] C. Snoeyink, S. Wereley, "Single-image far-field subdiffraction limit imaging with axicon", *OPTICS LETTERS*, Vol. 38, No. 5, (2013)
- [13] M. Soskind, R. Soskind, "Producing superresolved point-spread functions using a phase modulation technique", *SPIE Vol.* 7787 77870T-3, (2010)
- [14] V. Micó, Z. Zalevsky, "Superresolved digital in-line holographic microscopy for high-resolution lensless biological imaging", *Journal of Biomedical Optics* 15 4 046027, (2010)
- [15] V. Micó, J. García, Z. Zalevsky B. Javidi, "Phase-shifting Gabor holography", *OPTICS LETTERS*, Vol. 34, No. 10 (2009)
- [16] Z. S. Hegedus, V. Safaris, "Superresolving filters in confocally scanned imaging systems", *J. Opt. Soc. Am. A/Vol.* 3, No. 11 (1986)

- [17] D.M. de Juana, J. E. Oti, V. F. Canales, M. P. Cagigal, "Transverse or axial superresolution in a 4Pi-confocal microscope by phase-only filters", *J. Opt. Soc. Am. A*/Vol. 20, No. 11/ (2003)
- [18] M. Nagorni, Stefan W. Hell, "4Pi-Confocal Microscopy Provides Three-Dimensional Images of the Microtubule Network with 100- to 150-nm Resolution", *JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY* 123, 236–247 ARTICLE NO. SB984037, (1998)
- [19] C. Maurer, A. Jesacher, S. Bernet, M. Ritsch-Marte, "What spatial light modulators can do for optical microscopy", *Laser Photonics Rev.* 5, No. 1, 81–101 (2011)
- [20] William Ross McCluney (1994), *Introduction to Radiometry and Photometry*, Artech House Boston London.
- [21] Edward L. O'Neill, "Transfer Function for an Annular Aperture", *J. OSA*, Vol. 4, N. 4, (1956)
- [22] N. Collings, T. Davey, J. Christmas, D. Chu, B. Crossland, "The Applications and Technology of Phase-Only Liquid Crystal on Silicon Devices", *JOURNAL OF DISPLAY TECHNOLOGY*, VOL. 7, NO. 3, (2011)
- [23] Kanghua Lu, Bahaa E.A. Saleh, "Theory and design of the liquid crystal TV as an optical spatial phase modulator", *Optical Engineering* 29(3), 240-246 (1990).
- [24] H. Tao Dai, K. Xu YanJun Liu, X. Wang, J. Liu, "Characteristics of LCOS Phase Only Spatial Light Modulators LCoS and its Applications", *Optics Communications*, 238, (2004) 269-276.
- [25] C.Y. Calderón Hermosillo, N. A. Ochoa, E. Noé Arias, J. G. Márquez, "Inspection of complex amplitudes of spatial light modulators using moiré techniques", *Optics and Lasers in Engineering* 51 (2013) 610–615
- [26] LI Martínez-León, Z. Jaroszewicz, A. Kołodziejczyk, V. Durán, E. Tajahuerce, J. Lancis, "Phase calibration of spatial light modulators by means of Fresnel images", *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 11 (2009) 125405.
- [27] S. A. Schelkunoff, "A Mathematical Theory of Linear Arrays", *Bell. Syst. Techn. Journ.* 22, 80 (1943).
- [28] K. T. Gahagan and G. A. Swartzlander, Jr., "Optical vortex trapping of particles", *OPTICS LETTERS*, Vol. 21, No. 11 (1996)
- [29] Gregory Foo, David M. Palacios, and Grover A. Swartzlander, Jr., "Optical vortex coronagraph", *OPTICS LETTERS*, Vol. 30, No. 24, (2005)
- [30] Taikei Suyama, Yaoju Zhang, "3D Super-resolution Fluorescence Microscopy Using Cylindrical Vector Beams", *Progress In Electromagnetics Research Letters*, Vol. 43, 73-81, 2013.

- [31] John H. McLeod, The Axicon: A New Type of Optical Element, *Journal of the Optical Society of America*, VOLUME 44, NUMBER 8 (1954).
- [32] Carl Paterson, Robin Smith, Higher-order Bessel waves produced by axicon-type computer-generated holograms, *Optics Communications* 124, 121-130, (1996).
- [33] R. M. Herman and T. A. Wiggins, Production and uses of diffractionless beams, *J. Opt. Soc. Am. A*, Vol. 8, No. 6 (1991).
- [34] J. Durnin and J. J. Miceli, Jr., Diffraction-Free Beams, *Physical Review Letters* vol. 58 No. 15, (1987)
- [35] Shiro Fujiwara, Optical Properties of Conic Surfaces. I. Reflecting Cone, *J. Opt. Soc. Am.* Vol. 52, Num. 3, (1962)
- [36] J. A. Davis, Don M. Cottrell, J. Campos, M. Yzuel, I. Moreno, Encoding amplitude information onto phase only filters, *Applied Optics / Vol. 38, No. 23/* (1999).
- [37] Vidal F. Canales, José E. Oti, Manuel P. Cagigal, Three-dimensional control of the focal light intensity distribution by analytically designed phase masks, *Optics Communications* 247, 11–18 (2005)
- [38] Vidal F. Canales and Manuel P. Cagigal, Pupil filter design by using a Bessel functions basis at the image plane, *OPTICS EXPRESS* 10393, Vol. 14, No. 22, (2006)
- [39] Brynmor J. Davis, William C. Karl, Anna K. Swan, M. Selim Ünlü, Capabilities and limitations of pupil-plane filters for superresolution and image enhancement, *OPTICS EXPRESS* 4151, Vol. 12, No. 17, (2004)
- [40] Olivier Guyon, Phase-Induced Amplitude Apodization of Telescope Pupils for Extrasolar Terrestrial Planet Imaging, *arXiv:astro-ph/0301190*, (2003).
- [41] Jahja I. Trisnadi, Speckle contrast reduction in laser projection displays, *Proceedings of SPIE* Vol. 4657 (2002).
- [42] Born & Wolf (1970), *Principles of Optics*, Pergamon Press.
- [43] http://holoeve.com/wp-content/uploads/PLUTO_Phase_Only_Modulator.pdf
- [44] Noé Alcalá Ochoa, Carlos Pérez-Santos, Super-resolution with complex masks using a phase-only LCD, *Optics Letters*, Vol. 38, Issue 24, pp. 5389-5392 (2013)