

TESIS DE MAESTRÍA

Diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada para la medición cuantitativa de propiedades polarimétricas en muestras biológicas

Camilo Antonio Cano Barrera
ccanoba@eafit.edu.co

Escuela de Ciencias

Departamento de Ciencias Físicas

Maestría en Física Aplicada

Universidad EAFIT

2017

DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN MICROSCOPIO DE LUZ
POLARIZADA PARA LA MEDICIÓN CUANTITATIVA DE
PROPIEDADES POLARIMÉTRICAS EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS

CAMILO ANTONIO CANO BARRERA

Tesis de Maestría presentada como requerimiento parcial para optar
al título de Magíster en Física Aplicada

Director

Ph.D. RENÉ RESTREPO GÓMEZ

Universidad EAFIT

ESCUELA DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FÍSICAS

MAESTRÍA EN FÍSICA APLICADA

UNIVERSIDAD EAFIT

2017

*“La ciencia no es más que sentido común
amaestrado y organizado”.*

Thomas Huxley

Licencia

Este documento se encuentra sujeto a la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 2.5 para Colombia de Creative Commons. Para mayor información, visite:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/co/>



Usted es libre para:

- Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato
- Adaptar** — remezclar, transformar y crear a partir del material

El licenciente no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

- Atribución** — Usted debe darle crédito a esta obra [de manera adecuada](#), proporcionando un enlace a la licencia, e [indicando si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo del licenciente.
- NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [fines comerciales](#).
- CompartirIgual** — Si usted mezcla, transforma o crea nuevo material a partir de esta obra, usted podrá distribuir su contribución siempre que utilice [la misma licencia](#) que la obra original.

No hay restricciones adicionales — Usted no puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otros hacer cualquier uso permitido por la licencia.



Agradecimientos

Quisiera agradecer en primera instancia a mi familia por el apoyo que han dado durante este nuevo capítulo de mi vida. A René por creer en mí y darme la oportunidad de trabajar en el grupo, en donde he pasado unos momentos únicos que me han permitido crecer profesionalmente y como persona. A mi primo Sebastián por la ayuda con los experimentos. A los compañeros del laboratorio, especialmente a Carlos quien se a convertido en un referente de esfuerzo y dedicación en el laboratorio, y quien siempre (que no estaba "mala leche") tuvo la disposición para ayudarme. A Luciano, por haberme invitado a hacer parte del laboratorio desde hace unos años. Finalmente, a la universidad EAFIT por el apoyo económico mediante los proyectos internos que me permitieron estudiar la Maestría.

Resumen

La microscopía de luz polarizada es una técnica de medida basada en el estudio de los cambios en el estado de polarización de la luz al interactuar con medios ópticos. Esta técnica es utilizada para analizar la anisotropía en las propiedades óptica de un espécimen, como lo son la refracción y absorción. Su implementación se realiza mediante la integración de elementos ópticos que permitan modificar el estado de polarización de la luz, permitiendo controlar la polarización del haz con que se ilumina la muestra y analizar el estado resultante luego de interactuar con el medio. El modelo más básico de un microscopio de polarización utiliza un par de polarizadores cruzados para generar una imagen de interferencia de color en muestras cristalinas, pero debido a la capacidad de la técnica para observar estructuras en tejidos biológicos, nuevos diseños se han elaborado para permitir la realización de medidas cuantitativas. En este trabajo se presenta el diseño de un microscopio de luz polarizada para la medición cuantitativa de propiedades ópticas en muestras biológicas.

En este documento se desarrolla un marco teórico relacionado a la descripción del estado de polarización de la luz y su representación matemática, para esto se abordan dos de las descripciones matriciales más ampliamente utilizadas, el cálculo de Jones y el cálculo de Mueller-Stokes. Además, se definen las propiedades ópticas de los medios asociadas a la polarización, y se presenta un método para el cálculo de estas mediante la realización de un conjunto de medidas de intensidad. Para probar el método se evaluó una ventana óptica sometida a cargas termo-mecánicas, generando así birrefringencia por esfuerzo. Las propiedades ópticas que se calcularon para la ventana fueron contrastadas contra los resultados obtenidos mediante una aplicación basada en la teoría de la fotoelasticidad. Se encontró que los resultados experimentales eran correspondientes a los obtenidos mediante simulaciones, con algunos errores asociados a las dificultades para modelar todas las condiciones termo-mecánicas del sistema experimental.

En este trabajo se llevó a cabo el diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada, los diseños y elementos utilizados son descritos mediante el uso del software OpticStudio de Zemax. El microscopio construido cuenta con dos sistemas de iluminación basados en el iluminador de Koehler, para permitir la realización de medidas a transmisión y reflexión. Además, el instrumento cuenta con un conjunto de sistemas de rotación que componen un polarímetro, permitiendo generar y analizar cualquier estado de polarización. La sección asociada al desarrollo del microscopio se finaliza con un análisis sobre las características asociadas a la magnificación, resolución y propiedades ópticas del instrumento.

En la sección final del documento se presenta un conjunto de medidas realizadas con el microscopio de luz polarizada. Muestras de diferente naturaleza son observadas, incluyendo: un polarizador lineal que se utilizó como muestra de control. Se midió un circuito impreso para ejemplificar las correcciones que se deben de implementar sobre los sistemas polarimétricos. También se realizaron medidas sobre trozos de cinta celofán, para mostrar la diferencia entre realizar medidas con un sistema de microscopia y un sistema formador de imagen convencional. Además, atendiendo a los objetivos del trabajo se midieron diferentes muestras biológicas como: un diente en el que se

identificó caries a partir de la despolarización que se da debido a procesos de desmineralización asociados a la presencia de placa bacteriana. Se presenta la capacidad de observar a través de medios turbios con técnicas polarimétricas, ejemplificado por la observación de células epiteliales de una cebolla superpuestas con agua. Se ilustra como las técnicas polarimétrica pueden ser utilizadas para el control de alimentos mediante la medición de almidón. Adicionalmente, se presentan dos ejemplos en los que se hace evidente la utilidad de realizar mediciones cuantitativas de las propiedades ópticas de muestras biológicas, el primero es un análisis sobre tres hojas con diferente capacidad para realizar fotosíntesis, donde se observa que esta tiene relación con la despolarización introducida por la hoja cuando se le observa a reflexión. El segundo ejemplo es la medición del espesor de fibras, a través del cual donde se determinó la birrefringencia de un cabello humano.

Finalmente, se presenta una aplicación del método de multimonoscopia para obtener información topográfica en muestras biológicas. Se mide el tejido epitelial de una cebolla y se obtienen imágenes en los diferentes planos ($x - y$, $x - z$, $y - z$), para la información de retardo y despolarización de la muestra. Se observa que al utilizar la información de retardo se pueden resaltar algunas características específicas, como la membrana celular.

Contenido

| | |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| Licencia | 7 |
| Agradecimientos | 9 |
| Resumen | 11 |
| Contenido | 13 |
| Lista de figuras | 17 |
| Lista de acrónimos | 21 |
| 1. Introducción | 23 |
| 1.1. Microscopio de luz polarizada | 25 |
| 1.2. Planteamiento del problema | 29 |
| 1.3. Objetivos | 32 |
| 1.3.1. Objetivo General | 32 |
| 1.3.2. Objetivos Específicos | 32 |
| 1.4. Estructura del documento | 33 |
| Referencias | 35 |
| 2. Conceptos teóricos y prácticos de polarimetría | 41 |
| 2.1. Ecuaciones de Maxwell y la ecuación de onda | 41 |
| 2.2. La elipse de polarización | 45 |
| 2.2.1. Casos particulares de la elipse de polarización | 49 |

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3. | Propiedades polarimétricas en medios | 50 |
| 2.3.1. | Diatenuación-Dicroísmo | 51 |
| 2.3.2. | Birrefringencia-Retardo | 52 |
| 2.3.3. | Despolarización y polarizancia | 53 |
| 2.4. | Cálculo de Jones | 54 |
| 2.5. | Parámetros de Stokes | 58 |
| 2.5.1. | Obtención de los parámetros de Stokes | 58 |
| 2.5.2. | Matriz de Mueller | 61 |
| 2.6. | Cálculo de la matriz de Mueller | 64 |
| 2.6.1. | Método de descomposición polar | 70 |
| 2.7. | Interpretación de las propiedades polarimétricas de la matriz de Mueller 73 | |
| 2.7.1. | Validez física de la matriz de Mueller | 73 |
| 2.7.2. | Diatenuación | 74 |
| 2.7.3. | Polarizancia | 75 |
| 2.7.4. | Despolarización | 76 |
| 2.7.5. | Retardancia | 76 |
| | Referencias | 79 |
| | 3. Aplicación de métodos polarimétricos | 83 |
| 3.1. | Birrefringencia por esfuerzo | 83 |
| 3.1.1. | Esfuerzos mecánicos y la elipsoide de Fresnel | 84 |
| 3.1.2. | Ley de estrés óptico | 86 |
| 3.1.3. | Cálculo de la matriz de Jones mediante el modelo de fotoelasticidad | 90 |
| 3.2. | Sistema experimental | 92 |
| 3.3. | Simulación | 95 |
| 3.3.1. | Cálculo de esfuerzos y deformaciones | 96 |
| 3.3.2. | Procesamiento en matlab | 99 |
| 3.4. | Resultados y análisis | 101 |

Referencias **109**

4. Diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada **111**

- 4.1. Tópicos generales de los sistemas de microscopía 111
 - 4.1.1. Componentes principales de un microscopio 114
 - 4.1.2. Microscopio a reflexión 116
- 4.2. Consideraciones de diseño 117
 - 4.2.1. Estructura mecánica 118
 - 4.2.2. Sistema de iluminación 119
 - 4.2.3. Formación de imagen 123
 - 4.2.4. Polarización en sistemas formadores de imagen 124
- 4.3. Diseño y Simulación 128
 - 4.3.1. Sistema de iluminación 129
 - 4.3.2. Formación de imagen 134
 - 4.3.3. Análisis del sistema diseñado 136
- 4.4. Implementación 144
- 4.5. Análisis del instrumento 146
 - 4.5.1. Iluminación 146
 - 4.5.2. Magnificación 148
 - 4.5.3. Contraste y resolución 150
 - 4.5.4. POTF del sistema 154
- 4.6. Propiedades polarimétricas en muestras biológicas 156

Referencias **161**

5. Medidas experimentales y análisis de resultados **165**

- 5.1. Medidas de polarización del microscopio de luz polarizada 165
 - 5.1.1. Muestra 1: polarizador lineal 165
 - 5.1.2. Muestra 2: circuito impreso 167
 - 5.1.3. Muestra 3: cinta celofán sobre una moneda 168
 - 5.1.4. Medida 4: diente 170

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.1.5. Muestra 5: tejido epidermis cebolla | 171 |
| 5.1.6. Muestra 6: almidón | 172 |
| 5.1.7. Muestra 7: hojas de árbol | 174 |
| 5.1.8. Muestra 8: cabello humano | 178 |
| 5.2. Multimonoscopía para la reconstrucción de objetos 3D | 180 |
| Referencias | 185 |
| 6. Conclusiones y trabajo futuro | 191 |
| 6.1. Respecto a los objetivos específicos | 191 |
| 6.2. Sobre los resultados obtenidos y las propuestas | 193 |
| 6.3. Trabajo futuro | 194 |

Lista de figuras

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2-1. Elipse de polarización. | 47 |
| 2-2. Rotación del sistema coordenado de la elipse de polarización | 48 |
| 2-3. Dirección de la elipse de polarización | 48 |
| 2-4. Estados degenerados de la elipse de polarización. | 51 |
| 2-5. Modelo de un polarímetro a transmisión | 65 |
| 3-1. Representación del tensor de esfuerzos. | 85 |
| 3-2. Elipsoide de Fresnel | 87 |
| 3-3. Sistema de carga | 93 |
| 3-4. Polarímetro para medidas de birrefringencia por esfuerzo | 94 |
| 3-5. Ventana analizada para polarización horizontal y vertical. | 95 |
| 3-6. Geometría y mallado para la simulación de la ventana. | 97 |
| 3-7. Grados de libertad, simulación ventana óptica. | 98 |
| 3-8. Gradiente de temperaturas del modelo térmico. | 99 |
| 3-9. Esfuerzo de Von Mises del modelo. | 100 |
| 3-10. Esquema trazado de rayos | 101 |
| 3-11. Ventana de FS sometida a una carga puntual. | 102 |
| 3-12. Mapas de retardo y rotación para una ventana sometida a cargas mecánicas. | 103 |
| 3-13. Mapas de retardo (a) y rotación (b) para una ventana simulada. | 104 |
| 3-14. Mapa de polarización para una carga mecánica. | 105 |
| 3-15. Imágenes ventana sometida a deformación termo-mecánica. | 106 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3-16. Mapas de retardo y rotación para una ventana sometida a cargas termo- mecánicas. | 107 |
| 3-17. Mapa de polarización para una carga termo-mecánica. | 108 |
| 4-1. Diagrama magnificación angular, transversal y longitudinal. | 112 |
| 4-2. Esquema básico de un microscopio a transmisión. | 114 |
| 4-3. Esquema básico de un microscopio a reflexión. | 117 |
| 4-4. Estructura para el montaje del microscopio. | 119 |
| 4-5. Sistema de rotación para PSA y PSG. | 120 |
| 4-6. Esquema básico de un iluminador de Koehler. | 122 |
| 4-7. Esquema de un iluminador de Koehler con lente de <i>relay</i> | 122 |
| 4-8. Curva de transmitancia en una superficie para polarización p y s . . . | 126 |
| 4-9. Curva de diatenuación a transmisión y reflexión | 127 |
| 4-10. Trazado de rayos colector a transmisión | 130 |
| 4-11. Trazado de rayos lente de <i>relay</i> a transmisión | 130 |
| 4-12. Trazado de rayos condensador a transmisión | 131 |
| 4-13. Sistema de iluminación a transmisión. | 132 |
| 4-14. Trazado de rayos colector a reflexión | 132 |
| 4-15. Trazado de rayos lente de <i>relay</i> a transmisión | 133 |
| 4-16. Trazado de rayos condensador a reflexión. | 133 |
| 4-17. Sistema de iluminación a reflexión. | 134 |
| 4-18. Trazado de rayos objetivo de 10X olympus | 135 |
| 4-19. Trazado de rayos sistema 2f. | 135 |
| 4-20. Imagen simulada. | 136 |
| 4-21. Diagrama de Spot iluminación. | 137 |
| 4-22. MTF del sistema formador de imagen del microscopio. | 139 |
| 4-23. PSF y frente de onda simulados. | 139 |
| 4-24. Mapa de polarización microscopio a transmisión. | 142 |
| 4-25. POTF del microscopio a transmisión. | 143 |
| 4-26. Mapa de polarización microscopio a reflexión. | 143 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4-27. POTF del microscopio a transmisión. | 144 |
| 4-28. Vista isométrica del montaje final. | 145 |
| 4-29. Esquema vista superior del montaje final. | 145 |
| 4-30. Campo de iluminación microscopio | 147 |
| 4-31. Histograma iluminación. | 147 |
| 4-32. Regla Carl Zeiss | 148 |
| 4-33. Magnificación del microscopio | 149 |
| 4-34. Imagen USAF 1951. | 151 |
| 4-35. MTF a transmisión calculada mediante PSF. | 152 |
| 4-36. MTF calculada mediante un Step. | 153 |
| 4-37. POTF del microscopio a transmisión. | 155 |
| 4-38. POTF del microscopio a reflexión. | 156 |
| | |
| 5-1. Imágenes polarimétricas de un polarizador líneal. | 166 |
| 5-2. Imagen de retardo de un circuito por fotolitografía. | 167 |
| 5-3. Moneda de 200\$. | 168 |
| 5-4. Medición de una moneda con cinta celofán. | 169 |
| 5-5. Medición de una moneda con cinta celofán a 10X. | 170 |
| 5-6. Caries observadas en dientes mediante medidas polarimétricas. | 172 |
| 5-7. Imagen de una cebolla observada a 10X. | 173 |
| 5-8. Muestra de almidón observada mediante tinción. | 173 |
| 5-9. Medición de almidón mediante microscopía de luz polarizada. | 175 |
| 5-10. Conjunto de hojas para la medición de efectos polarimétricos. | 176 |
| 5-11. Imagenes hojas microscopio a 20X. | 177 |
| 5-12. Histograma para el cálculo de despolarización en hojas | 177 |
| 5-13. Cabello humano observado mediante microscopio de luz polarizada. . . | 178 |
| 5-14. Perfil retardo en el cabello | 179 |
| 5-15. Esquema método de multimonoscopia | 181 |
| 5-16. Datos 3D tejido epitelial cebolla despolarización. | 182 |
| 5-17. Datos 3D tejido epitelial cebolla retardo | 183 |

Lista de acrónimos

- OCT** - Optical coherence tomography - Tomografía óptica de coherencia.
- ADN** - Ácido desoxirribonucleico.
- SLM** - Spatial light modulator - Modulador espacial de luz.
- LHP** - Linear horizontal polarization - Polarización lineal horizontal.
- LVP** - Linear vertical polarization - Polarización lineal vertical.
- L+45P** - Linear +45 polarization - Polarización lineal +45.
- L-45P** - Linear -45 polarization - Polarización lineal -45.
- RCP** - Right circular polarization - Polarización circular derecha.
- LCP** - Left circular polarization - Polarización circular izquierda.
- DOP** - Degree of polarization - Grado de polarización.
- DOLP** - Degree of linear polarization - Grado de polarización lineal.
- DOCP** - Degree of circular polarization - Grado de polarización circular.
- PSG** - Polarization state generator - Generador de estados de polarización.
- PSA** - Polarization state analyzer - Analizador de estados de polarización.
- FS** - Fused silica - Silicio fundido.
- APDL** - Mechanical ANSYS Parametric Design Language.
- FEM** - Finite element method - Metodo de elementos finitos.
- NA** - Numerical aperture - Apertura numérica.
- MTF** - Modulation transfer function - Función de transferencia de modulación.
- OCM** - Optical coherence microscopy - Microscopía óptica de coherencia.
- u.a.** - Unidades arbitrarias.

Capítulo 1

Introducción

Desde sus inicios, la humanidad ha demostrado un notable deseo por explorar lo desconocido. Esta motivación la ha llevado a desarrollar tecnologías y formular teorías que han permitido estudiar el universo desde sus componentes más básicos, como son los átomos, hasta gigantescas estructuras que se encuentran en los confines del espacio [1]. Una de las ramas de la física que más ha contribuido en la construcción del conocimiento es la óptica, campo encargado de estudiar la interacción de la luz con la materia [2, 3]. No es de extrañar que la luz despierte interés en la humanidad, ya que desde nuestro origen ha sido vital las actividades del día a día [4]. Por ejemplo, todos sabemos que no podemos ver nada sin luz, pero la luz también puede ayudarnos en campos como la producción de energía, educación, agricultura, comunicaciones y ciencias de la salud. Y como muestra de la importancia de las tecnologías y contribuciones realizadas en base al estudio de la óptica, en el 2015 la organización de las naciones unidas declaró ese año como el año internacional de la luz, resaltando la relevancia que ésta tiene en nuestras vidas y motivando a continuar estudios en este campo en vista a futuras aplicaciones [4].

En la actualidad, la humanidad cuenta con dos instrumentos emblemáticos de las ciencias ópticas, el microscopio y el telescopio [1, 2]. Estos instrumentos demuestran la versatilidad de la óptica y sus aplicaciones, ya que el primero ayuda al hombre a observar estructuras diminutas, mientras que el segundo permite ver gigantescos cuerpos celestes que se encuentran a grandes distancias [1]. No obstante, considerando

la larga historia de la humanidad estos fueron desarrollados hasta hace poco. Fue con el desarrollo de los primeros espejos hace más de tres mil años que el hombre comienza a manipular el comportamiento de la luz [2]. Con el posterior descubrimiento del vidrio y la construcción de las primeras lentes aproximadamente hace dos mil años, se obtienen las herramientas básicas para la puesta en práctica de las primeras tecnologías ópticas [2]. Sin embargo, no es hasta el siglo XV y XVI que se empiezan a dar desarrollos relevantes en las tecnologías ópticas con la invención de los primeros telescopios y microscopios. Desde entonces, la óptica ha presentado un constante desarrollo, el cual se ha visto fuertemente impulsado con la teoría ondulatoria de la luz propuesta a principios del siglo XVII y posteriormente aceptada, luego de que James Clerk Maxwell (1831-1879) presentara las ecuaciones del electromagnetismo [3].

Entendiendo la naturaleza electromagnética de la luz, una gran cantidad de implementaciones empiezan a desarrollarse, considerando que el comportamiento de la luz puede modelarse como una onda y no únicamente como partícula [5]. Algunas de las técnicas más destacables que pudieron ser comprendidas y puestas en práctica son las técnicas interferométricas y polarimétricas, las cuales son explicadas a partir de la teoría ondulatoria y modeladas a través de las ecuaciones de Maxwell [3]. La implementación de las nuevas técnicas y desarrollos ópticos a los dispositivos ya existentes no se hizo esperar, y así, se desarrollaron nuevos métodos en algunas de las prácticas más clásicas. Un buen ejemplo es el microscopio óptico, el cual diversificó enormemente su campo de acción al integrar técnicas de interferometría y polarimetría; esto sumado a las entonces emergentes fuentes laser, ha dado origen a un amplio conjunto de dispositivos que a nuestros días incluyen el microscopio de campo claro, oscuro, contraste diferencial, fluorescencia, luz polarizada, confocal, entre muchos otros [6].

Los dispositivos ópticos como el microscopio tienen aplicación en una gran variedad de disciplinas, entre las que resalta la biología, en donde el microscopio se ha convertido en su instrumento más representativo al permitir la observación de pequeñas estructuras imperceptibles a simple vista [7, 8]. La necesidad de dar respuesta a preguntas cada vez más complejas ha llevado al desarrollo de equipos mucho más so-

fisticados y precisos, pero que además proveen información adicional de las muestras. Debido a esto, en los últimos años el microscopio ha evolucionado de un instrumento observacional a una herramienta analítica [6], soportado en los desarrollos en el área de la óptica y motivado por las fascinantes interacciones que se dan entre la luz y los medios biológicos.

Uno de los campos de la óptica que más ha contribuido en los últimos años a la caracterización de muestras biológicas es la polarimetría. Los efectos polarimétricos se presentan con mucha frecuencia en los medios biológicos, debido a la aparición de estructuras ordenadas y periódicas propias de algunos tejidos o compuestos, o a la anisotropía de los medios turbios que generan cambios representativos en el estado de polarización de la luz [7]. Las imágenes polarimétricas proveen información estructural de las muestras analizadas, llevando a su implementación en diferentes dispositivos, como en la tomografía óptica de coherencia (OCT por sus siglas en inglés) [9, 10], la microscopía confocal [11, 12], o en el propio microscopio de luz polarizada [13, 14].

En este trabajo se aborda el diseño y desarrollo de un microscopio de luz polarizada que genere imágenes de despolarización, diatenuación y retardo de las muestras. Estas medidas permiten realizar análisis cuantitativos sobre las muestras, facilitando la tarea de diagnóstico.

1.1. Microscopio de luz polarizada

La microscopía de luz polarizada es una técnica que permite medir los cambios introducidos por una muestra en el estado de polarización de la luz, lo que posibilita en muchos casos, realzar el contraste en las imágenes observadas con este método [7]; o inclusive apreciar estructuras y efectos que normalmente no son visualizables en técnicas de microscopía convencionales, tales como en la microscopía de campo claro [8]. Los cambios en la polarización se dan debido a la interacción entre la luz y la estructura interna de la muestra, por lo que desde su desarrollo, esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el estudio de estructuras cristalinas, particularmente en áreas como la geología [15]. En la actualidad el conjunto de aplicaciones de la

microscopía de luz polarizada se ha diversificado, siendo la biomedicina uno de sus campos de acción más relevantes, debido a que es posible obtener imágenes *in-vivo* o identificar la presencia de patógenos mediante el monitoreo de cambios en las propiedades ópticas de los especímenes [16, 17]. En este documento nos referiremos a la birrefringencia, diatenuación y despolarización como las propiedades polarimétricas de los medios, ya que estas son las propiedades ópticas asociadas a los cambios en el estado de polarización de la luz.

En los microscopios de luz polarizada convencionales, un par de polarizadores cruzados son utilizados para generar un estado de polarización de referencia y analizar los efectos introducidos por la muestra [13]. En términos simples, un polarizador es un elemento que deja pasar únicamente la luz polarizada en un plano específico al que se le denomina plano de polarización [18], de esta manera si dos polarizadores se ubican con su plano de polarización perpendicularmente, el segundo absorberá toda la luz proveniente del primero. Si un elemento con propiedades polarimétricas se coloca entre los polarizadores cruzados, y este introduce cambios en el estado de polarización de la luz, una fracción de la intensidad podrá ser registrada acorde con la ley de Malus [18]. La medición de los cambios en intensidad presentados por la imagen de una muestra ubicada entre dos polarizadores cruzados, da información de la presencia de birrefringencia, despolarización o dicroísmo en la muestra [19], lo que permite resaltar estructuras internas sin necesidad de procesos de tinción, además de posibilitar la distinción entre componentes aparentemente idénticos bajo medidas de campo claro, o bien, determinar la estructura cristalina de la muestra [20].

Cuando se emplea luz policromática para iluminar las muestras, las imágenes obtenidas presentan un patrón de interferencia de color, puesto que las diferentes longitudes de onda se ven afectadas en distintas proporciones por las propiedades polarimétricas de las muestras [20, 21]. En las imágenes obtenidas a través de un microscopio de luz polarizada es posible discernir efectos polarimétricos a partir de la observación de los patrones de color [20]. Adicionalmente, en algunos casos es de interés conocer la magnitud de dichas propiedades, por ejemplo, en muestras birrefringentes se emplean compensadores para determinar el retraso introducido por la

muestra [14]. Los compensadores son placas retardadoras variables que se utilizan para aumentar los efectos de desfase inducidos por la muestra, o para cuantificar los desfases en ésta. Su funcionamiento consiste en ubicar el compensador después de la muestra, luego variar el retardo que éste produce hasta que la intensidad registrada para una zona de interés sea cero, esto indica que el retraso introducido por el compensador es correspondiente al que presenta la muestra o su complementario [22]. Este método tiene la ventaja de ser relativamente sencillo y rápido de implementar, no obstante, no es muy preciso y requiere en gran medida de la habilidad del observador para realizar una medición acertada.

En polarimetría existen técnicas para la medición cuantitativa de las propiedades polarimétricas de una muestra con base en el cálculo de Mueller-Stokes y Jones [23]. Este segundo presenta la limitante de que únicamente funciona para luz coherente, además de que las muestras no deben causar despolarización en la luz [18]. El cálculo de Mueller se basa en la determinación de una matriz, que representa los cambios en la polarización generados por una muestra en la notación de Stokes [18, 24]. Para el cálculo de la matriz de Mueller existen diferentes métodos, el más utilizado consiste en la realización de medidas de intensidad, obtenidas mediante la combinación de diferentes estados de polarización en el generador y analizador de estados de un polarimetro [23]. A través de un conjunto de operaciones algebraicas entre las intensidades medidas, se determinan los 16 términos que componen la matriz de Mueller, la cual a su vez puede ser descrita como el producto de tres matrices, una de retardo de fase, otra de despolarización y finalmente una de diatenuación, obtenidas haciendo uso del método de descomposición polar [25, 26].

Existen aplicaciones de laboratorio diseñadas para la realización de medidas de microscopía de luz polarizada, en las que se usan moduladores espaciales de luz (*Spatial Light Modulator*. SLM) para realizar medidas polarimétricas *in-vivo* [27, 28], con la particularidad de que estas se suelen limitar al estudio de una única propiedad óptica del medio. Por ejemplo, mediante el uso de un conjunto de SLMs para modificar la polarización de la luz en un microscopio, se puede medir en tiempo real el retardo introducido por los compuestos proteicos al interior de un espermatozoide sin causar

degeneración celular, ignorando efectos de despolarización y diatenuación [28].

La microscopía de luz polarizada tiene aplicación en diferentes disciplinas como la geología, la biomedicina y varias ramas de la industria que incluyen el análisis de asbestos, químicos, fibras, materiales, electrónica e incluso técnicas forenses [20]. En geología su aplicación es directa, ya que permite diferenciar entre tipos de rocas, determinar su composición, la dirección de sus planos cristalinos, cómo fue su formación, entre muchas otras propiedades. Esto llevó a que las primeras implementaciones de la microscopía de luz polarizada fueran en esta disciplina en donde también se le denomina microscopía petrográfica [15]. Otra de las aplicaciones de la microscopía de luz polarizada es el estudio de esfuerzos o fallas estructurales en elementos que presentan birrefringencia por esfuerzo, en este caso es posible medir cambios en la birrefringencia del material asociados a esfuerzos en las muestras, mediante las leyes de la fotoelasticidad [29].

En la industria, el uso de microscopios de luz polarizada se ha convertido en una gran herramienta para el análisis y caracterización de los productos. En campos como la química de alimentos permite medir con facilidad la presencia de azúcares, grasas o proteínas, donde cada uno de estos presenta diferentes propiedades polarimétricas. Los azúcares y proteínas actúan como cristales, presentando efectos de retardo de fase [11, 12], mientras que los lípidos se pueden considerar medios turbios en los que se dan efectos de despolarización [30, 31]. También hay aplicaciones en la producción de cerámicos o fibras, en donde la técnica permite diferenciar fases entre compuestos cerámicos, y determinar el espesor de las fibras mediante medidas del retardo de fase [32].

La biomedicina es uno de los mayores campos de acción para la microscopía de luz polarizada. Existen diferentes aplicaciones de la técnica, probablemente la más común es su uso para mejorar el contraste en muestras biológicas, ya sea por sí misma o en conjunto con métodos de tinción [33]. Un ejemplo de la implementación de esta técnica es la identificación temprana de gota, enfermedad que consiste en la concentración de cristales de urato monosódico en las articulaciones del cuerpo. Mediante la observación de fluido sinovial del paciente se puede hacer un análisis de la presencia de cristales de

urea, lo que indicaría la posibilidad de que el paciente presente gota [34]. El motivo por el que la microscopía de luz polarizada es tan funcional para este tipo de aplicaciones, es debido a que la mayoría de cristales presentan efectos polarimétricos apreciables. Otras aplicaciones son la observación de proteínas y sus procesos de formación como en el ADN (Ácido DesoxirriboNucleico) [27, 35], o la identificación de tejidos cancerosos [36–38] entre otros.

1.2. Planteamiento del problema

En microscopía óptica una fuente de radiación electromagnética es utilizada para hacer imagen de una muestra de interés, esto es posible gracias a que la interacción radiación materia produce cambios en las propiedades de las ondas electromagnéticas, cuando se da un cambio de medio o durante la propagación en éste [39]. En particular, las técnicas de microscopía óptica trabajan en el espectro visible de las ondas electromagnéticas, debido a que en principio la técnica fue desarrollada para que las muestras pudieran ser observadas con el ojo humano [21, 40]. Además, la resolución de un microscopio está limitado por la ley de Abbe [21, 40], en donde se relaciona la capacidad de identificar detalles de un sistema óptico con la longitud de onda de la iluminación. En consecuencia, mientras menor sea la longitud de onda utilizada mejor será la resolución del sistema, sin embargo, hay limitaciones en cuanto a la fabricación y desarrollo de equipos para longitudes de onda cortas [41].

Con base en los argumentos expuestos, la microscopía óptica se ha establecido como una técnica versátil, efectiva y fácil de implementar, aunque con sus limitaciones inherentes. Debido a que la longitud de onda de la iluminación del sistema se encontraba limitada al rango del espectro visible, otras técnicas debieron ser desarrolladas para explotar el potencial del microscopio óptico. Sagazmente, varios investigadores propusieron que los diferentes fenómenos presentes en la interacción radiación materia podían ser analizados, y no únicamente la absorción y reflexión que se habían utilizado clásicamente [33]. Algunos de los procesos físicos que tuvieron más éxito al momento de su implementación fueron el esparcimiento, la fluorescencia y la po-

larización. Este último de particular interés y aplicación en estudio de estructuras cristalinas y muestras biológicas [42].

Una de las principales aplicaciones de la microscopía óptica es la observación de especímenes biológicos, ya que esta técnica es no invasiva y permite la observación de las muestras sin necesidad de destruirlas o alterar sus propiedades. No obstante, existen algunos métodos que por su simplicidad son utilizados para mejorar el contraste en muestras biológicas, a pesar de que éstos causan muerte o degeneración celular, siendo la tinción el más utilizado [33]. La tinción consiste en usar colorantes o tinturas para resaltar estructuras o identificar compuestos en tejidos u organelos a nivel celular, mediante la fijación de un colorante a una cadena protéica, un carbohidrato, lípido, u otro compuesto biológico [43]. Existen colorantes y métodos de tinción que permiten observar muestras biológicas *in-vivo*, lo que posibilita apreciar los procesos de funcionamiento celular, aun así, estas técnicas son nocivas para los tejidos biológicos [43].

Existen métodos que aumentan el contraste de especímenes biológicos sin necesidad de utilizar compuestos químicos, como lo son la microscopía de contraste de fase o la microscopía de luz polarizada [28, 44]. Estas técnicas tienen la ventaja de aumentar el contraste sin necesidad de intervenir las muestras, en su lugar se realizan modificaciones en el sistema de iluminación y formación de imagen del microscopio. En el mercado se encuentran dispositivos en los que es relativamente sencillo migrar de una técnica a otra, por ejemplo, existen microscopios en los que es posible cambiar entre microscopía de campo claro y microscopía de luz polarizada mediante la adición o remoción de un par de polarizadores, uno ubicado antes y otro después de la muestra [45].

Ahora bien, se han mencionado diferentes aspectos de las técnicas de microscopía y sus aplicaciones, haciendo referencia en diferentes ocasiones al microscopio de luz polarizada, técnica que es de gran interés para el grupo de Óptica Aplicada de la universidad EAFIT, debido a que es un campo de aplicación para diferentes desarrollos en técnicas de polarimetría apropiadas por éste [46, 47]. Adicionalmente, dado el contexto nacional y local, Colombia es un país con una amplia diversidad biológica

y un importante desarrollo en procedimientos médicos, por lo tanto, la investigación en tecnologías para el estudio de muestras biomédicas está acorde a las necesidades del medio.

Retomando el problema, en las técnicas de microscopía de luz polarizada más clásicas, la muestra se ubica entre dos polarizadores cruzados que generan un patrón de interferencia de color, en función de la magnitud de las propiedades polarimétricas de la muestra [15]. En este caso, tiene gran influencia sobre la medida la capacidad del observador para encontrar la orientación en que la muestra presenta mejor contraste [15, 40]. La ventaja de esta configuración es que logra mejorar el contraste del sistema a través de una sola combinación entre polarizador y analizador, lo cual la hace una técnica de rápido procesamiento, para la observación y registro de los procesos al interior de las muestras [28].

Existen diseños de microscopios de luz polarizada que realizan medidas cuantitativas de las propiedades polarimétricas de las muestras, facilitando así la obtención e interpretación de la información [28, 48]. Sin embargo, este tipo de sistemas requieren un generador y un analizador de estados de polarización, los cuales consisten en un arreglo de láminas retardadoras y polarizadores ubicados antes y después de la muestra [49]. Además, se requiere del procesamiento de un conjunto de imágenes polarimétricas para determinar las propiedades de la muestra, haciendo el proceso más lento con respecto al arreglo clásico de polarizadores cruzados. Estos diseños de microscopio no son ampliamente comercializados como el modelo de polarizadores cruzados, sin embargo, la posibilidad de medir de manera cuantitativa las propiedades de las muestras presenta varias ventajas como: la identificación de compuestos, discernir estructuras con mayor precisión o simplemente asistencia en los procesos de evaluación de resultados [50, 51].

Conociendo las ventajas y limitaciones de la microscopía de luz polarizada, la propuesta de este trabajo de grado consiste en el diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada para la medición cuantitativa de propiedades polarimétricas, permitiendo de esta manera generar imágenes de desfase, dicroísmo y despolarización de las muestras. El proceso de adquisición de imágenes polarimétricas estará auto-

matizado mediante un sistema de rotadores en el generador y analizador de estados de polarización. Un aspecto que no se abordará durante el trabajo de grado es la realización de medidas en tiempo real, por lo que el sistema no podrá medir procesos dinámicos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Diseñar e implementar un microscopio de luz polarizada para uso de laboratorio, que permita realizar medidas cuantitativas de las propiedades polarimétricas en muestras biológicas.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Identificar el estado de arte de la microscopía con luz polarizada en aplicaciones biológicas.
- Generar modelos computacionales que permitan recrear las características de muestras birrefringentes y dicroicas para facilitar la comprensión de los mecanismos asociados a estos.
- Utilizar el método de descomposición polar para obtener las matrices de retardo de fase, dicroísmo y despolarización de la matriz de Mueller de una muestra, y generar las correspondientes imágenes.
- Diseñar un sistema de microscopía de luz polarizada haciendo uso de software de diseño asistido por computador especializado en modelos ópticos (ZEMAX).
- Implementar un sistema de microscopía de luz polarizada para aplicaciones en laboratorio.
- Levantar topografía en muestras microscópicas haciendo uso de un conjunto

de medidas monoscópicas, en las que se pueda visualizar las propiedades polarimétricas de las muestras.

1.4. Estructura del documento

El documento se encuentra dividido en seis capítulos en los cuales se abordarán los objetivos específicos del trabajo de grado. El primer objetivo, relacionado con la generación de un estado del arte de la microscopía de luz polarizada y sus aplicaciones, se trata a lo largo de todo el documento, mediante el desarrollo de los diferentes conceptos necesarios para abordar las etapas de diseño, implementación del microscopio, además del análisis de resultados. En el Capítulo 1 se presentan los conceptos básicos de la microscopía de luz polarizada, partiendo desde el modelo más simple: el microscopio de polarización por polarizadores cruzados, el cual permitió recalcar la importancia de la técnica y como esta ha evolucionado dando paso al desarrollo de microscopios que miden de manera cuantitativa el efecto de los medios sobre la polarización de la luz. Se hizo mención de algunas aplicaciones del instrumento, demostrando la versatilidad y pertinencia de la técnica en los ámbitos de la industria y la investigación.

El Capítulo 2 está orientado al marco teórico de las técnicas de polarimetría, enfocado en la notación matemática utilizada para la descripción de la polarización de la luz y los medios con los que interactúa. A grandes rasgos se presentan dos notaciones, el cálculo de Jones y el cálculo de Mueller-Stokes, los cuales están basados en métodos matriciales y permiten mediante una descripción matemática modelar como los medios afectan el estado de la polarización de la luz. Adicionalmente, se aborda el método de descomposición polar que permite discernir entre las diferentes propiedades ópticas de los medios asociadas a la polarización, siendo estas: la retardancia o birrefringencia, la diatenuación o dicroísmo, la polarizancia y la despolarización.

En el Capítulo 3 se realiza un primer acercamiento a las técnicas de polarimetría, mediante el estudio de la birrefringencia por esfuerzo. En este capítulo se presenta un breve marco teórico del modelo de fotoelasticidad, utilizado para determinar cam-

bios en el índice de refracción de los medios sometidos a esfuerzos externos. Haciendo uso de un polarímetro se realiza un conjunto de medidas experimentales sobre una muestra controlada, y sobre las imágenes obtenidas se implementan los modelos presentados en el Capítulo 2, para de esta manera validarlos previo a su implementación en el microscopio. Adicionalmente, se presenta un modelo computacional que permite determinar los cambios en las propiedades polarimétricas de un medio, mediante el modelo de la fotoelasticidad, y se compara con los resultados experimentales de una ventana óptica.

En el Capítulo 4 se presenta el diseño e implementación del microscopio de polarización, componente central de este trabajo de grado. Se parte de algunos conceptos básicos de microscopía y se procede a presentar las consideraciones de diseño, introduciendo así los conceptos asociados al sistema de iluminación utilizado, algunas características de los sistemas de formación de imagen y las causas de efectos polarimétricos no deseados en sistemas ópticos. Luego, se muestra el diseño realizado en Zemax al igual que los diferentes componentes utilizados en el microscopio. Finalmente, se analiza el desempeño del instrumento.

En el Capítulo 5 se presentan los resultados obtenidos mediante el microscopio de luz polarizada, para los que se utilizaron muestras de fácil adquisición tales como cinta celofán o almidón, en los que el análisis de los resultados fuera posible incluso sin un extenso conocimiento en biología. Además se implementó el método de multimicroscopía para levantar la topología de las muestras, y se evaluó el cambio en la polarización cuando se mide los efectos polarimétricos de la muestra en varios planos de enfoque.

En el Capítulo 6 se evalúa el cumplimiento de los objetivos del trabajo de grado, a partir de las implementaciones y resultados obtenidos. Asimismo, se resumirán brevemente las características del microscopio desarrollado, y se planteará el trabajo futuro para la línea de microscopía en la que se ha llevado a cabo este trabajo de grado.

Referencias

- [1] R. Steffo. *Microscopes and Telescopes*. Great Inventions Group 3. Marshall Cavendish Benchmark, 2007. [23](#)
- [2] W.J. Croft. *Under the Microscope: A Brief History of Microscopy*. Series in popular science. World Scientific, 2006. [23](#), [24](#)
- [3] E. Hecht. *Optics*. Addison Wesley, 1301 Sonsomen St., San Francisco, United States, 4th edition, 2002. [23](#), [24](#)
- [4] International Year of Light and Light Based Technologies. About the year of light. Accessed: 2017-11-01. <http://www.light2015.org/Home/About.html>. [23](#)
- [5] A. Lipson, S.G. Lipson, and H. Lipson. *Optical Physics*. Cambridge University Press, 2010. [24](#)
- [6] R. Fischer. *Optical System Design, Second Edition*. McGraw Hill professional. Mcgraw-hill, 2008. [24](#), [25](#)
- [7] J. James and H.J. Tanke. *Biomedical Light Microscopy*. Springer Science & Business Media, 2012. [24](#), [25](#)
- [8] V. Pattabhi and N. Gautham. *Biophysics*. Springer Science and Business Media, 2002. [24](#), [25](#)
- [9] Z. Wang, H. Lee, O. Ahsen, B. Lee, W. Choi, B. Potsaid, J. Liu, V. Jayaraman, A. Cable, M. Kraus, K. Liang, J. Hornegger, and J. Fujimoto. Depth-encoded all-

- fiber swept source polarization sensitive oct. *Biomed. Opt. Express*, **5**(9):2931–2949, Sep 2014. [25](#)
- [10] S. Fialova, M. Augustin, R. Plasenzotti, S. Rauscher, M. Groger, M. Pircher, C. Hitzenberger, and B. Baumann. Comparison of the polarization properties in the retinas of different rodents using high resolution polarization sensitive oct. In *Optical Coherence Imaging Techniques and Imaging in Scattering Media*, page 95410P. Optical Society of America, 2015. [25](#)
- [11] G Coticchio, R. Sciajno, K. Hutt, J. Bromfield, A. Borini, and D. Albertini. Comparative analysis of the metaphase {II} spindle of human oocytes through polarized light and high-performance confocal microscopy. *Fertility and Sterility*, **93**(6):2056–2064, 2010. [25](#), [28](#)
- [12] J. Lazar, A. Bondar, S. Timr, and S.J. Firestein. Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. *Nature Methods*, **8**:2056–2064, 2010. [25](#), [28](#)
- [13] S.I. Bozhevolnyi, M. Xiao, and O. Keller. External-reflection near-field optical microscope with cross-polarized detection. *Applied Optics*, **33**(5):876–888, 1994. [25](#), [26](#)
- [14] R. Oldenbourg and G. Mri. New polarized light microscope with precision universal compensator. *Journal of Microscopy*, **180**(2):140–147, 1995. [25](#), [27](#)
- [15] A.B. Poole and I. Sims. *Concrete Petrography: A Handbook of Investigative Techniques, Second Edition*. CRC Press, 2016. [25](#), [28](#), [31](#)
- [16] N. Ghosh, M. Wood, S. Li, R. D. Weisel, B. C. Wilson, R. Li, and I. A. Vitkin. Mueller matrix decomposition for polarized light assessment of biological tissues. *Journal of Biophotonics*, **2**(3):145–156, March 2009. [26](#)
- [17] M. Todorovic, S. Jiao, L. V. Wang, and G. Stoica. Determination of local polarization properties of biological samples in the presence of diattenuation by use of

- Mueller optical coherence tomography. *Optics letters*, **29**(20):2402–2404, 2004. [26](#)
- [18] E. Collett. *Field guide to polarization*. Number v. FG05 in SPIE field guides. SPIE Press, Bellingham, Wash, 2005. [26](#), [27](#)
- [19] M. H. Smith. Interpreting Mueller matrix images of tissues. In *BiOS 2001 The International Symposium on Biomedical Optics*, pages 82–89. International Society for Optics and Photonics, 2001. [26](#)
- [20] R. Haynes. *Optical Microscopy of Materials*. Springer Science & Business Media, 2013. [26](#), [28](#)
- [21] H. C. Lee, R. Ramotowski, and R. E. Gaensslen. *An Introduction to Microscopy*. CRC press, 2001. [26](#), [29](#)
- [22] Olympus. Introduction to compensators and retardation plates. Accessed: 2017-05-17. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/polarized/compensators.html>. [27](#)
- [23] K. Dev and A. Asundi. Mueller–stokes polarimetric characterization of transmissive liquid crystal spatial light modulator. *Optics and Lasers in Engineering*, **50**(4):599–607, 2012. [27](#)
- [24] J.M. Lopez-Tellez and N.C. Bruce. Stokes polarimetry using analysis of the nonlinear voltage-retardance relationship for liquid-crystal variable retarders. *Review of Scientific Instruments*, **85**(3):033104 1–11, 2014. [27](#)
- [25] L. Shih-Yau and R. A. Chipman. Interpretation of mueller matrices based on polar decomposition. *Journal of the Optical Society of America A*, **13**(5):1106–1113, 1996. [27](#)
- [26] F. Boulvert, G. Le Brun, B. Le Jeune, J. Cariou, and L. Martin. Decomposition algorithm of an experimental mueller matrix. *Optics Communications*, **282**(5):692–704, 2009. [27](#)

- [27] S. Abrahamsson, M. McQuilken, S. B. Mehta, A. Verma, J. Larsch, R. Ilic, R. Heintzmann, C. I. Bargmann, A. S. Gladfelter, and R. Oldenbourg. Multifocus polarization microscope (mf-polscope) for 3d polarization imaging of up to 25 focal planes simultaneously. *Optics Express*, **23**(6):7734–7754, 2015. [27](#), [29](#)
- [28] M. Shribak and R. Oldenbourg. Techniques for fast and sensitive measurements of two-dimensional birefringence distributions. *Applied Optics*, **42**(16):3009–3017, 2003. [27](#), [28](#), [30](#), [31](#)
- [29] K. B. Doyle, V. L. Genberg, and G. J. Michels. *Integrated optomechanical analysis*. Number PM223 in SPIE Press. SPIE Press, Bellingham, Washington, USA, second edition edition, 2012. [28](#)
- [30] S. Bin, D. Mohd, T. Rimaux, D. Van de Walle, K. Dewettinck, and A. R. Patel. Oil structuring properties of monoglycerides and phytosterols mixtures. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **119**(3):1500517–n/a, 2017. 1500517. [28](#)
- [31] C. G. Avio, S. Gorbi, and F. Regoli. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from adriatic sea. *Marine Environmental Research*, **111**:18–26, 2015. [28](#)
- [32] P. Lesiak and T. Wolinski. Numerical analysis of stress distribution in embedded highly birefringent PANDA fibers. In Hypolito J. Kalinowski, José Luís Fabris, and Wojtek J. Bock, editors, *24th International Conference on Optical Fibre Sensors*, page 963464, September 2015. [28](#)
- [33] D.L. Spector and R.D. Goldman. *Basic Methods in Microscopy: Protocols and Concepts from Cells : a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. [28](#), [29](#), [30](#)
- [34] Y. Yoo, Y. Seo, M. Huh, J. Yoo, K. Yun, and S. Kim. Gout and coexisting

- pseudogout in the knee joint. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, **19**(4):553–555, 2011. [29](#)
- [35] J. Sipe, M. Benson, J. Buxbaum, S. Ikeda, G. Merlini, M. Saraiva, and P. Westermark. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*, **21**(4):221–224, 2014. [29](#)
- [36] I. Acerbi, L. Cassereau, I. Dean, Q. Shi, A. Au, C. Park, Y. Y. Chen, J. Liphardt, E. S. Hwang, and V. M. Weaver. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ecm stiffening and immune cell infiltration. *Integrative Biology*, **7**(10):1120–1134, 2015. [29](#)
- [37] D. A. Boas, C. Pitris, and N. Ramanujam. *Handbook of biomedical optics*. CRC press, 2011. [29](#)
- [38] J. Woo, I. Do, A. Sang-Gun, Y. Jung-Hoon, K. Sungho, and H. Byeong. Full-field optical coherence microscopy for identifying live cancer cells by quantitative measurement of refractive index distribution. *Optics Express*, **18**(22):23285–23295, 2010. [29](#)
- [39] K. Giewekemeyer. *A Study on New Approaches in Coherent X-ray Microscopy of Biological Specimens*. Göttingen series in x-ray physics. Univ.-Verlag Göttingen, 2011. [29](#)
- [40] S. Amelinckx, D. Van Dyck, J. Van Landuyt, and G. Van Tendeloo. *Handbook of Microscopy: Applications in Materials Science, Solid-State Physics, and Chemistry. Methods II*. John Wiley & Sons, 2008. [29](#), [31](#)
- [41] C. Weilun, K. Jihoon, S. Rekawa, P. Fischer, and E. Anderson. Demonstration of 12 nm resolution fresnel zone plate lens based soft x-ray microscopy. *Optics Express*, **17**(20):17669–17677, 2009. [29](#)
- [42] P. Hawkes and J. Spence. *Science of microscopy*. Springer Science & Business Media, 2008. [30](#)

-
- [43] G.J. Tortora, B.R. Funke, and C.L. Case. *Introducción a la microbiología*. Médica Panamericana, 2007. 30
- [44] L. Tian, J. Wang, and L. Waller. 3d differential phase-contrast microscopy with computational illumination using an led array. *Optics Letters*, **39**(5):1326–1329, 2014. 30
- [45] R. Stoiber and S. Morse. *Crystal Identification with the Polarizing Microscope*. Springer US, Boston, MA, 1994. 30
- [46] C. Cano, R. Restrepo, and P. Zuluaga. Analysis of optomechanical method for materials selection in optical design. In *Latin America Optics and Photonics Conference*, 2016. 30
- [47] S. Echeverri. Generacion y Caracterizacion de Vortices Opticos Mediante Moduladores Espaciales de Luz. Master’s thesis, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia, 2015. 30
- [48] M. I. Shribak and R. Oldenbourg. 3d imaging properties of a polarized light microscope revealed by birefringence measurements of small calcite crystals. In *BiOS 2001 The International Symposium on Biomedical Optics*, pages 81–91. International Society for Optics and Photonics, 2001. 31
- [49] Rudolf Oldenbourg. Analysis of edge birefringence. *Biophysical journal*, **60**(3):629, 1991. 31
- [50] J. Baba. *The use of polarized light for biomedical applications*. PhD thesis, Texas A&M University, 2004. 31
- [51] J. M. Zavislan. *Imaging system using polarization effects to enhance image quality*. Google Patents, October 2000. US Patent 6,134,010. 31

Capítulo 2

Conceptos teóricos y prácticos de polarimetría

En este capítulo se describirán los conceptos básicos de polarimetría necesarios para el desarrollo de un microscopio de luz polarizada. Se inicia con la descripción de una onda electromagnética y su interacción con los medios, para caer en la definición de la elipse de polarización y su representación matemática. Luego se describen brevemente las propiedades polarimétricas de los medios y se procede a definir las notaciones de Jones y Mueller-Stokes para la descripción de la polarización de la luz y su interacción con medios ópticos. Finalmente, se presenta un método para el cálculo de la matriz de Mueller a partir de medidas de intensidad, el método de descomposición polar y cómo calcular las propiedades óptica de un medio a partir de su representación matemática.

2.1. Ecuaciones de Maxwell y la ecuación de onda

Las propiedades de la luz en un medio se describen a partir de las cuatro ecuaciones del electromagnetismo de Maxwell. Estas ecuaciones representan el comportamiento del campo eléctrico y magnético de la onda, y vienen dadas por las siguientes expresiones:

$$\nabla \times \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} = 0 \text{ (Ley de Faraday),} \quad (2.1)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} - \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} = \mathbf{J} \text{ (Ley de Ampere),} \quad (2.2)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho \text{ (Ley de Gauss eléctrica),} \quad (2.3)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = 0 \text{ (Ley de Gauss magnética),} \quad (2.4)$$

donde \mathbf{J} y ρ son la densidad de corriente (A/m^2) y de carga (C/m^3) respectivamente. \mathbf{D} es la densidad de flujo del campo eléctrico (C/m^2), \mathbf{H} es la intensidad de campo magnético (A/m), \mathbf{B} es la inducción magnética (Wb/m^2 o T) y \mathbf{E} es la intensidad de campo eléctrico (V/m). Para completar las ecuaciones de Maxwell hay otras tres expresiones en las que están presentes los parámetros que caracterizan los diferentes medios a través de los cuales se propagan el campo eléctrico y magnético, dichos parámetros son la constante dieléctrica ϵ (F/m), la permeabilidad magnética μ (H/m) y la conductividad eléctrica σ ($\Omega^{-1} \cdot m$) [1, 2].

$$\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E}, \quad (2.5)$$

$$\mathbf{B} = \mu \mathbf{H}, \quad (2.6)$$

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E}. \quad (2.7)$$

Para conocer la ecuación que describe la propagación de las ondas electromagnéticas en un material, se toma el rotacional de la primera ecuación de Maxwell (Eq. 2.1),

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) + \frac{\partial}{\partial t} (\nabla \times \mathbf{B}) = 0.$$

Teniendo en cuenta la identidad vectorial,

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) = \nabla(\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E},$$

y considerando que en un material eléctricamente neutro ($\rho = 0$) se cumple que $\nabla \cdot \mathbf{E} = 0$, se sustituye $\nabla \times \mathbf{B}$ por la segunda ecuación de Maxwell (Eq. 2.2) para

obtener:

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \epsilon \mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} + \sigma \mu_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}. \quad (2.8)$$

La expresión presentada en la Eq. 2.8, corresponde a una onda propagándose con pérdidas por transmisión y cuya solución¹ es:

$$\mathbf{E} = E_0 e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \omega t)}, \quad (2.9)$$

donde la magnitud del vector de onda \mathbf{k} (número de onda) para un medio isotrópico se define como [4]:

$$k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_r + i \frac{\sigma \mu_0}{\omega}}, \quad (2.10)$$

siendo c la velocidad de la luz en el vacío, ω la frecuencia de la onda, μ_0 la permeabilidad magnética del vacío y ϵ_r la constante dieléctrica relativa. Las Eq. 2.9 y Eq. 2.10 usan notación compleja, sin embargo, los campos son magnitudes físicas y en muchas aplicaciones suelen representarse por la parte real de la onda, ya que la parte compleja se pierde al realizar medidas de intensidad. Para una onda electromagnética en el vacío con longitud de onda λ , donde $\sigma = 0$ y $\epsilon_r = 1$,

$$k = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda}.$$

En un medio distinto al vacío, la velocidad de la fase $v = \frac{\omega}{k}$ cambia al dividir la velocidad de la luz en el vacío por un índice de refracción complejo,

$$v = \frac{c}{n_r},$$

donde el índice de refracción n_r viene dado por:

¹Para simplificar el problema se puede asumir que los materiales a tratar no presentan propiedades magnéticas, por lo que su permeabilidad es igual a la del vacío. Un análisis más detallado puede verse en [3].

$$\mathbf{n}_r = \sqrt{\epsilon_r + i \frac{\sigma \mu_0}{\omega}},$$

por lo cual k en un medio se define como:

$$k = \frac{\omega}{c} \mathbf{n}_r.$$

Se puede representar el índice de refracción complejo por su parte real y su parte imaginaria,

$$\mathbf{n}_r = \mathbf{n}'_r + \mathbf{n}''_r,$$

de forma que,

$$k = \frac{\mathbf{n}'_r \omega}{c} + i \frac{\mathbf{n}''_r \omega}{c} = k_{\text{real}} + i \frac{\alpha}{2}, \quad (2.11)$$

donde k_{real} y α son dos constantes reales asociadas a las propiedades ópticas del medio. Al sustituir la Eq. 2.11 en la Eq. 2.9 se puede describir un campo eléctrico propagándose en dirección z como:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cdot e^{-\frac{\mathbf{n}''_r \omega z}{c}} \cdot e^{i\omega(\frac{\mathbf{n}'_r z}{c} - t)} = \mathbf{E}_0 \cdot e^{-\frac{\alpha}{2}z} \cdot e^{i(k_{\text{real}}z - \omega t)}, \quad (2.12)$$

por lo que la velocidad de la onda será únicamente dependiente de la parte real de \mathbf{n}_r , mientras que su amplitud se amortiguará exponencialmente en función de \mathbf{n}''_r [2, 3]. La atenuación de la onda está relacionada con la absorción electromagnética. El coeficiente de absorción (también llamado constante de atenuación) α se define como:

$$\frac{\alpha}{2} = \frac{\mathbf{n}''_r \omega}{c}.$$

Realizando un proceso similar sobre la segunda ecuación de Maxwell (Eq. 2.2) se obtiene la ecuación de onda para el campo magnético [3],

$$\nabla^2 \mathbf{H} = \varepsilon \mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{H}}{\partial t^2} + \sigma \mu_0 \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t},$$

cuya solución es,

$$\mathbf{H} = \mathbf{H}_0 e^{i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)}. \quad (2.13)$$

2.2. La elipse de polarización

En 1670 Rasmus Bartholin (1625-1698) observó que cuando un rayo de luz natural incidía en un cristal romboédrico de calcita se dividía en dos rayos, demostrando así que un haz de luz está compuesto por dos componentes que llamó rayo ordinario y extraordinario [5, 6]. Adicionalmente, debido a que ambos rayos se refractan con diferentes ángulos, fue posible determinar que la calcita debía presentar dos índices de refracción, por lo que se le dio la denominación de medio birrefringente.

Posteriores investigaciones realizadas por Christiaan Huygens (1629-1695), demostraron que al colocar un segundo cristal analizador (un polarizador) en un determinado ángulo, la intensidad de uno de los rayos se extinguía mientras que la del otro se conservaba máxima [5, 6]. Una rotación adicional de 90° presentó un efecto igualmente interesante, el rayo que se encontraba extinguido alcanzaba su máxima intensidad mientras que el otro se extinguía [5, 6]. Con una rotación de solo 45° ambos rayos presentan la misma intensidad. Debido al comportamiento que presentaban ambos rayos, a estos se les dio la connotación de rayos polarizados [5, 6].

Alrededor de 1820 Augustin-Jean Fresnel (1788-1827) y Francois Aragon (1786-1853) demuestran experimentalmente que un campo de luz consiste en solo dos componentes ortogonales en el plano transversal a la dirección de propagación [5, 6]. Fresnel en su teoría ondulatoria, propone dos componentes ortogonales $\mathbf{u}_1(\mathbf{r}, t)$ y $\mathbf{u}_2(\mathbf{r}, t)$, que a la vista de los conocimientos desarrollados en el siglo XIX corresponderían a las componentes del campo eléctrico de las ecuaciones de onda electromagnética, obtenidas a partir de las leyes de Maxwell [5-7].

En base a los planteamientos mencionados, es posible asumir la existencia de un

campo \mathbf{E} que se propaga en dirección del eje z , cuyas componentes transversales vienen representadas por:

$$E_x(z, t) = E_{0x} \cos(\omega t - kz + \delta_x), \quad (2.14)$$

$$E_y(z, t) = E_{0y} \cos(\omega t - kz + \delta_y), \quad (2.15)$$

donde E_{0x} y E_{0y} son las amplitudes máximas del campo en sus respectivas direcciones, δ_x y δ_y son las fases iniciales. Aplicando identidades trigonométricas las Eq. 2.14 y Eq. 2.15 pueden reescribirse como [6]:

$$\frac{E_x(z, t)}{E_{0x}} = \cos(\sigma) \cos(\delta_x) - \text{sen}(\sigma) \text{sen}(\delta_x), \quad (2.16)$$

$$\frac{E_y(z, t)}{E_{0y}} = \cos(\sigma) \cos(\delta_y) - \text{sen}(\sigma) \text{sen}(\delta_y). \quad (2.17)$$

Si luego se multiplica la Eq. 2.16 por $\text{sen}(\delta_y)$ y la Eq. 2.17 por $\text{sen}(\delta_x)$, y se realiza la resta entre estos productos, se obtiene:

$$\frac{E_x(z, t)}{E_{0x}} \text{sen}(\delta_y) - \frac{E_y(z, t)}{E_{0y}} \text{sen}(\delta_x) = \cos(\sigma) \text{sen}(\delta_y - \delta_x), \quad (2.18)$$

de manera similar, multiplicando por $\cos(\delta_y)$ y $\cos(\delta_x)$ las ecuaciones Eq. 2.16 y Eq. 2.17, tenemos [6]:

$$\frac{E_x(z, t)}{E_{0x}} \cos(\delta_y) - \frac{E_y(z, t)}{E_{0y}} \cos(\delta_x) = \text{sen}(\sigma) \text{sen}(\delta_y - \delta_x). \quad (2.19)$$

Finalmente, al realizar la suma del cuadrado de las Eq. 2.18 y Eq. 2.19, se obtiene:

$$\frac{E_x^2}{E_{0x}^2} + \frac{E_y^2}{E_{0y}^2} - 2 \frac{E_x E_y}{E_{0x} E_{0y}} \cos(\delta) = \text{sen}^2(\delta), \quad (2.20)$$

donde $\delta = \delta_y - \delta_x$. La Eq. 2.20 corresponde a la ecuación de una elipse y muestra que para un instante t , la distribución del campo eléctrico correspondiente a un campo óptico a medida que se propaga, es una elipse como la que se aprecia en la Fig. 2-1.

La polarización óptica se define como el plano de oscilación del campo eléctrico de la luz a medida se desplaza en el espacio [6, 7], y debido a que la Eq. 2.20 representa este fenómeno, recibe el nombre de elipse de polarización.

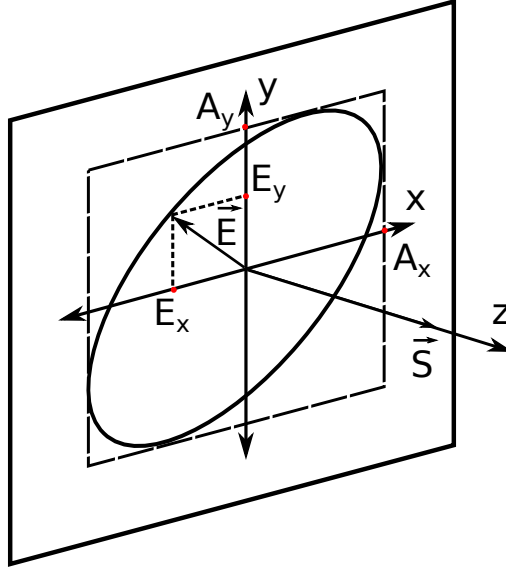


Figura 2-1: Elipse de polarización.

Por otra parte, si se define un ángulo de rotación ϕ con respecto al eje x , de forma tal que el eje mayor de la elipse esté alineado con el eje horizontal de un determinado sistema coordenado, como se puede apreciar en la Fig. 2-2, se obtiene la forma más conocida de la Eq. 2.20,

$$\left(\frac{E_{x'}}{a}\right)^2 + \left(\frac{E_{y'}}{b}\right)^2 = 1, \quad (2.21)$$

donde a y b son los semi ejes mayor y menor, y $E_{x'}$, $E_{y'}$ son las componentes del campo eléctrico en las direcciones x' y y' . La elipticidad se define como la razón entre el eje menor y el eje mayor de la elipse $e = \pm \frac{b}{a}$, y su signo determina el sentido de giro de la elipse; si el signo es positivo la elipse es dextrógira y es levógira cuando el signo es negativo [8]. Se debe aclarar que el sentido de giro de la polarización es una convención que varía dependiendo de la perspectiva con que se observa la propagación de la onda, en este documento se interpreta el sentido de giro como si el campo \mathbf{E} se observara desde un punto ubicado por delante del haz [7, 8]. En la Fig. 2-3 se tiene

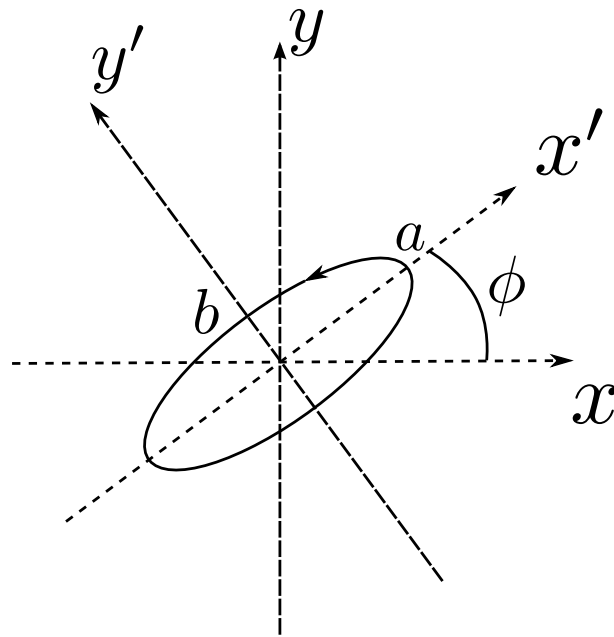


Figura 2-2: Rotación del sistema de coordenadas para un ángulo ϕ .

la representación gráfica para los estados de polarización circular derecha e izquierda bajo la notación utilizada.

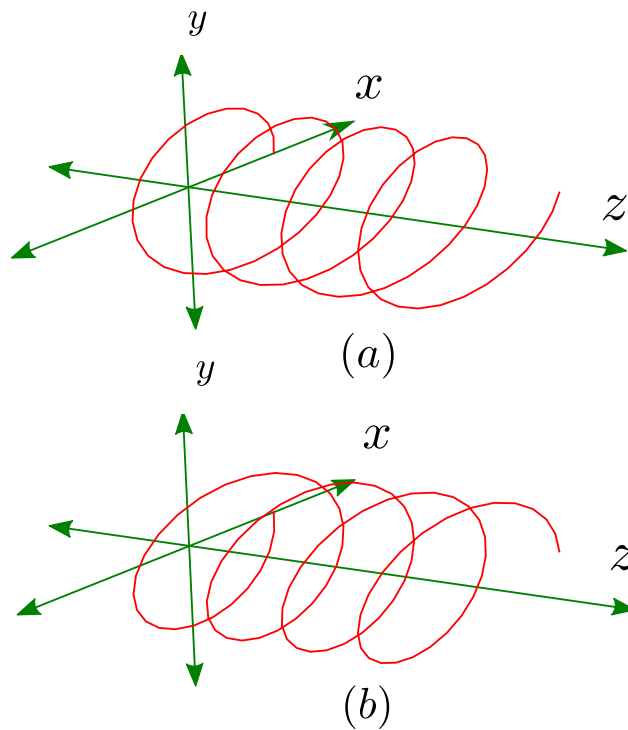


Figura 2-3: (a) Polarización circular derecha, (b) polarización circular izquierda. Imagen adaptada de [8].

Entonces, una elipse de polarización arbitraria se puede expresar conociendo su elipticidad (e) y su ángulo de inclinación (ϕ) con respecto al eje horizontal. Donde el ángulo ϕ se describe como²:

$$\phi = \frac{1}{2} \text{sen}^{-1} \left(\frac{2E_x E_y}{E_x^2 - E_y^2} \cos \delta \right). \quad (2.22)$$

2.2.1. Casos particulares de la elipse de polarización

La Eq. 2.20 presenta determinados casos particulares, también llamados estados degenerados, que se dan para un conjunto de valores E_{0x} , E_{0y} y δ . Los diferentes estados degenerados de la elipse de polarización pueden ser contenidos en tres casos que se presentan a continuación [5]:

1. $E_{0y} = 0$. Para este caso $E_y(z, t)$ es cero, por lo que el campo será descrito únicamente por la Eq. 2.14, así que en este caso solamente hay oscilación del campo eléctrico en la dirección del eje x . En este contexto se dice que la luz está linealmente polarizada en la dirección x , o con polarización horizontal. De igual forma, si $E_{0x} = 0$ y $E_y(z, t) \neq 0$ solo habrá oscilación en el eje y y se dice que la luz está linealmente polarizada en y , o polarizada verticalmente.
2. Si $\delta = 0$ ó $n\pi$ ($n = [1, \infty)$), la Eq. 2.20 se reduce a:

$$\frac{E_x^2}{E_{0x}^2} + \frac{E_y^2}{E_{0y}^2} \pm 2 \frac{E_x}{E_{0x}} \frac{E_y}{E_{0y}} = 0. \quad (2.23)$$

Se factoriza y despeja E_y de la Eq. 2.23:

$$\left(\frac{E_x}{E_{0x}} \pm \frac{E_y}{E_{0y}} \right)^2 = 0, \quad E_y = \pm \frac{E_{0x}}{E_{0y}} E_x. \quad (2.24)$$

La Eq. 2.24 corresponde a la ecuación de una línea recta con una pendiente de $\pm \frac{E_{0x}}{E_{0y}}$ e intercepto en 0. Para este caso se dice que la luz se encuentra linealmente polarizada con un ángulo de $\pm \frac{E_{0x}}{E_{0y}}$ (rad). Para un valor de $\delta = 0$ se tiene una

²Una descripción más detallada de como obtener la Eq. 2.22 puede encontrarse en [6, 8].

pendiente negativa, mientras que para $\delta = \pi$ es positiva. Si $E_{0x} = E_{0y}$ se tiene que $E_y = \pm E_x$. En este caso si la pendiente es positiva se dice que la luz está linealmente polarizada a $+45^\circ$, y en el caso contrario que la luz está linealmente polarizada a -45° .

3. Para $E_{0x} = E_{0y} = E_0$ y $\delta = (2n - 1)\pi/2$ ($n = [1, \infty)$), la Eq. 2.20 se reduce a:

$$\frac{E_x^2}{E_0^2} + \frac{E_y^2}{E_0^2} = 1. \quad (2.25)$$

La Eq. 2.25 es la ecuación de un círculo. Para este caso se dice que la luz tiene polarización circular derecha (dextrógira) o izquierda (levógira) para $\delta = \pi/2$ o $3\pi/2$ respectivamente.

En la Fig.2-4 se pueden apreciar los estados degenerados de la elipse de polarización³.

2.3. Propiedades polarimétricas en medios

Es bien conocido que entre la radiación electromagnética y la materia se llevan a cabo una gran variedad de interacciones, como por ejemplo el efecto fotoeléctrico [9]. Con base en las características de la luz y la forma en la que esta interactúa con los medios, es posible definir algunas propiedades asociadas. Cuando se desea evaluar la interacción entre la luz polarizada y los medios, la pregunta a responder es: ¿Qué efecto tiene el medio sobre el estado de polarización de la luz?

Las propiedades polarimétricas de los medios pueden agruparse en tres casos: la propiedad de un medio para generar luz polarizada, la propiedad de despolarizar la luz, y la propiedad de introducir cambios en la fase entre componentes del campo eléctrico [10]. Además, todas las propiedades polarimétricas tienen una dependencia

³LHP: Polarización horizontal, LVP: Polarización vertical, L+45P: Polarización lineal a $+45^\circ$, L-45P: Polarización lineal a -45° , RCP: Polarización dextrógira, LCP: Polarización levógira.

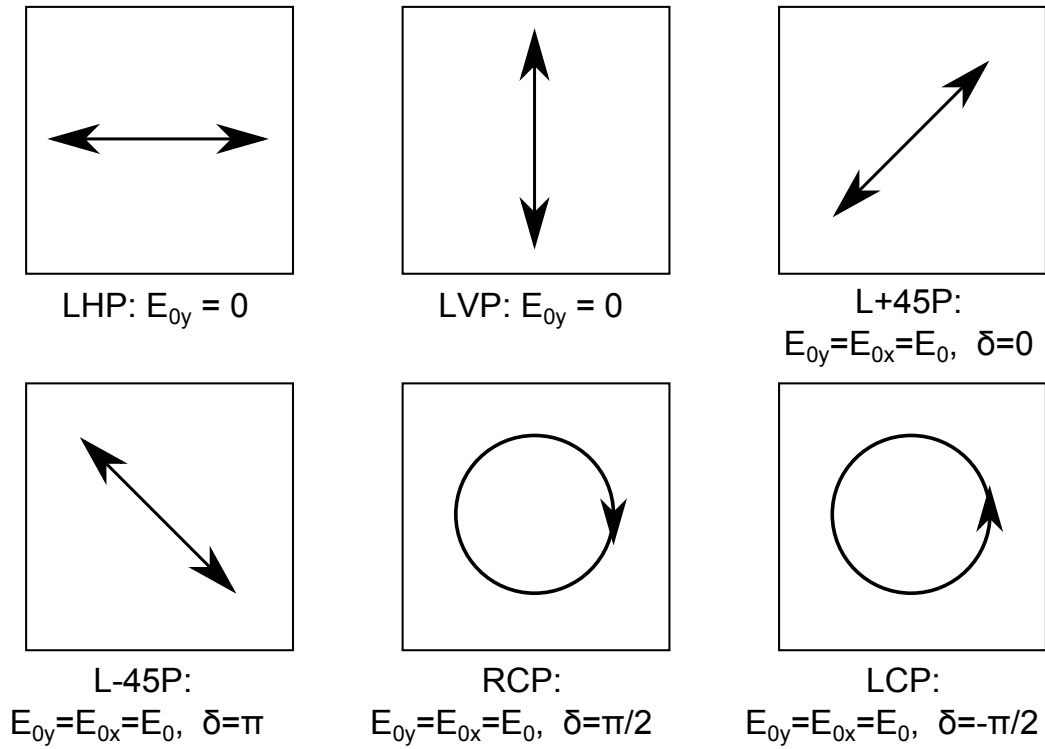


Figura 2-4: Estados degenerados de la elipse de polarización.

de la longitud de onda y dirección de incidencia de la luz. A continuación, se describirá cada uno de estos fenómenos.

2.3.1. Diatenuación-Dicroísmo

La diatenuación también conocida como dicroísmo, se asocia a la capacidad de un medio para presentar diferentes transmitancias en función del estado de polarización de la luz. En un diatenuador ideal, la intensidad transmitida es máxima para un estado incidente y cero para su estado ortogonal, dicho comportamiento es presentado por un polarizador ideal. No obstante, la diatenuación puede darse de manera tal que tan solo un porcentaje de una o ambas componentes sea atenuado. Para cuantificar la diatenuación de un medio se usa la siguiente definición [10]:

$$D(\lambda) = \frac{I_{\max}(\lambda) - I_{\min}(\lambda)}{I_{\max}(\lambda) + I_{\min}(\lambda)}, \quad (2.26)$$

donde $D(\lambda)$ es la diatenuación del medio en función de la longitud de onda, e $I_{\max}(\lambda)$,

$I_{\min}(\lambda)$ son las intensidades máxima y mínima para un par de estados ortogonales. Debido a su dependencia de la longitud de onda, la diatenuación se ha utilizado en el estudio de compuestos mediante técnicas como la espectroscopía de dicroísmo lineal y circular [11, 12].

2.3.2. Birrefringencia-Retardo

La birrefringencia es una propiedad presentada por algunos materiales cristalinos que tienen un comportamiento ópticamente anisótropico, y así como lo indica el nombre, estos presentan dos índices de refracción. Para cada par de estados ortogonales que se propagan a través de un medio birrefringente, este posee un índice de refracción diferente, lo que implica que una de las componentes del campo eléctrico se propagará más rápido que la otra, introduciendo un desfase o retardo entre componentes, por ello a los elementos birrefringentes también se les conoce como retardadores. Los medios birrefringentes suelen caracterizarse por la diferencia entre sus índices de refracción [5, 13]:

$$\Delta n(\lambda) = |n_1(\lambda) - n_2(\lambda)|. \quad (2.27)$$

La birrefringencia $\Delta n(\lambda)$ depende de los índices del eje rápido $n_1(\lambda)$ y el eje lento $n_2(\lambda)$, también llamados índices del haz ordinario y extraordinario respectivamente, los cuales se encuentran en planos ortogonales y generalmente están sobre los planos principales del cristal. La birrefringencia puede encontrarse con frecuencia en cristales como la calcita, además en los laboratorios las láminas de $\lambda/4$ y $\lambda/2$ son un buen ejemplo de la implementación de los medios birrefringentes [7]. También es posible encontrar elementos que presentan birrefringencia por esfuerzo, un fenómeno mediante el cual un material en principio isotrópico, al ser sometido a una carga externa se hace birrefringente [14].

2.3.3. Despolarización y polarizancia

La despolarización puede definirse como la propiedad de un medio para convertir un haz polarizado en uno despolarizado, es decir, un haz que no posee un estado de polarización definido, sino, una superposición de todos los posibles estados de polarización [7, 10]. Dicha despolarización puede ser total o parcial, donde el primer caso indica que la luz se encontrará totalmente despolarizada luego de interactuar con el medio, en el segundo caso, se puede pensar que un porcentaje de la intensidad de la luz aún conserva sus condiciones polarimétricas de entrada, mientras que el resto se encuentra despolarizado. La despolarización en un medio se debe principalmente a efectos de esparcimiento o fenómenos de diatenuación y retardo de fase que cambian en el espacio, tiempo y/o con la longitud de onda [15].

Por otro lado, la polarizancia se refiere a la capacidad de un medio para polarizar la luz, puede considerarse un efecto opuesto a la despolarización y suele medirse a través del grado de polarización de la luz al pasar a través de un medio. En muchos medios la polarizancia y la diatenuación son iguales, dichos sistemas son llamados homogéneos [16]. Es posible asumir que cualquier efecto de polarización de la luz se debe a un efecto de diatenuación, en cuyo caso la noción de polarizancia sería innecesaria. Esto no es cierto, tomemos los siguientes dos ejemplos:

- Un polarizador seguido por un despolarizador perfecto. En este caso la intensidad transmitida por el polarizador depende de la polarización de la luz incidente. Sin embargo, luego de pasar por el despolarizador la luz se encontrará totalmente despolarizada. Como consecuencia el medio presentará diatenuación, pero no polarizancia[16].
- Un despolarizador perfecto seguido por un polarizador. Independiente del estado de polarización a la entrada, este sistema despolariza la luz y luego la polariza nuevamente. Debido a que no hay dependencia del estado de polarización a la entrada el sistema no presentará diatenuación, mientras que a la salida la luz siempre estará polarizada indicando un alto grado de polarizancia [16].

Ambas, la despolarización y la polarizancia de un medio se cuantifican en el intervalo $[0, 1]$, donde 0 indica ausencia del efecto evaluado y 1 presencia total. De esta manera un despolarizador perfecto presentará una despolarización de 1 y polarizancia de 0.

2.4. Cálculo de Jones

La descripción de la luz en términos de la elipse de polarización es un método bastante útil, ya que permite describir cualquier estado de polarización a partir de la Eq. 2.20, la elipticidad e y la orientación de la elipse en un determinado sistema coordenado, dado por ϕ . No obstante, esta representación presenta varios inconvenientes: en esta notación solamente es posible describir luz completamente polarizada, además, los cálculos asociados a la interacción de la luz con los medios pueden resultar difíciles y tediosos [6, 7, 17]. Existen diferentes técnicas para la representación del estado de polarización de la luz y las propiedades ópticas de los medios, basadas en la obtención de una matriz que los representa [5]. En esta sección se aborda uno de los métodos más utilizados.

El cálculo de Jones es una formulación matricial para la descripción del estado de polarización de la luz y componentes polarimétricos. En la representación de Jones, el estado de polarización de la luz consiste en un vector de 2×1 elementos que describe las componentes del campo, al cual se le denomina como vector de Jones, mientras que a los componentes con propiedades polarizadoras a transmisión o reflexión se les representa a partir de una matriz de 2×2 elementos, que se denomina matriz de Jones [5, 7]. La formulación de Jones solamente es válida para luz completamente polarizada, por lo que generalmente es utilizada para el tratamiento en fenómenos de interferencia o problemas en los que hay superposición de amplitudes de campo [5, 7].

El vector de Jones para un campo \mathbf{E} es:

$$\mathbf{E} = \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} E_{0x} e^{i\delta_x} \\ E_{0y} e^{i\delta_y} \end{bmatrix},$$

donde el primer y segundo elemento del vector, corresponden a las componentes del campo eléctrico ubicadas en los ejes x y y respectivamente.

Los vectores de Jones para los estados degenerados se presentan en la tabla 2.1:

Tabla 2.1: Vector de Jones de los estados de polarización degenerados

| | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| $\mathbf{E}_{\text{LHP}} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}$ | $\mathbf{E}_{\text{LVP}} = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix}$ | $\mathbf{E}_{\text{L+45P}} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix}$ |
| $\mathbf{E}_{\text{L-45P}} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ -1 \end{bmatrix}$ | $\mathbf{E}_{\text{RCPP}} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix}$ | $\mathbf{E}_{\text{LCPP}} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix}$ |

Los vectores de Jones son ortonormales y satisfacen la relación⁴ $\mathbf{E}_i^\dagger \cdot \mathbf{E}_j = \delta_{ij}$ [5], donde δ_{ij} (para $i = j$, $\delta_{ij}=1$; para $i \neq j$, $\delta_{ij}=0$) es la función delta de Kronecker.

La superposición de dos vectores de Jones ortogonales conlleva a otro vector de Jones, como por ejemplo:

$$\mathbf{E}_{\text{LHP}} + \mathbf{E}_{\text{LVP}} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix},$$

el cual, exceptuando la ausencia del término de normalización $1/\sqrt{2}$, corresponde a un haz polarizado linealmente a $+45^\circ$. En una forma más general, los vectores de Jones para LHP y LVP son [5]:

⁴El operador \dagger representa la transpuesta conjugada.

$$\mathbf{E}_{\text{LHP}} = \begin{bmatrix} E_{0x} e^{i\delta_x} \\ 0 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{E}_{\text{LVP}} = \begin{bmatrix} 0 \\ E_{0y} e^{i\delta_y} \end{bmatrix}, \quad (2.28)$$

superponiendo las expresiones de la Eq. 2.28, se tiene:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_{\text{LHP}} + \mathbf{E}_{\text{LVP}} = \begin{bmatrix} E_{0x} e^{i\delta_x} \\ E_{0y} e^{i\delta_y} \end{bmatrix}. \quad (2.29)$$

La Eq. 2.29 muestra la forma general del vector de Jones, el cual describe un haz con polarización elíptica a partir de un par campos ortogonales con amplitud (E_{0x}, E_{0y}) y fase (δ_x, δ_y) arbitrarios.

Un elemento polarizador físico se representa matemáticamente a través de una matriz 2×2 , la cual está relacionada a un vector de entrada de 2×1 elementos de forma tal que $\mathbf{E}' = \mathbf{J} \cdot \mathbf{E}$. Siendo \mathbf{J} la matriz que representa el elemento polarizador, \mathbf{E} el vector que representa el estado de polarización a la entrada y \mathbf{E}' el estado de polarización a la salida [5]. Por ejemplo, para un polarizador lineal, la matriz de Jones correspondiente es:

$$\mathbf{J}_{\text{POL}} = \begin{bmatrix} P_x & 0 \\ 0 & P_y \end{bmatrix}, \quad 0 \leq P_x, P_y \leq 1.$$

La matriz de Jones para un retardador con el eje rápido en x y un desfase δ_x y δ_y para los ejes x y y respectivamente es:

$$\mathbf{J}_{\text{WP}} = \begin{bmatrix} e^{i\delta_x} & 0 \\ 0 & e^{-i\delta_y} \end{bmatrix}. \quad (2.30)$$

Los retardadores ópticos se construyen a partir de materiales birrefringentes cortados con un espesor y orientación cuidadosamente elegidos, donde el eje rápido se refiere a la dirección en la que se encuentra el índice de refracción a través del cual la luz se desplaza con mayor velocidad, mientras que al eje ortogonal se le llama eje lento.

Debido a que la matriz de un retardador está orientada en la dirección del eje rápido, es necesario utilizar una matriz de rotación que permita orientarla en un ángulo θ respecto a un eje de referencia. La matriz de rotación en un plano cartesiano de dos dimensiones viene dada por,

$$\mathbf{R}(\theta) = \begin{bmatrix} \cos\theta & \text{sen}\theta \\ -\text{sen}\theta & \cos\theta \end{bmatrix}. \quad (2.31)$$

Así, para un elemento polarizador rotado, su matriz de Jones está dada por:

$$\mathbf{J}(\theta) = \mathbf{R}(-\theta) \cdot \mathbf{J}_{\text{WP}} \cdot \mathbf{R}(\theta). \quad (2.32)$$

Al reemplazar las Eq. 2.30 y Eq. 2.31 en la Eq. 2.32 se obtiene:

$$\mathbf{J}(\delta, \theta) = \begin{bmatrix} \cos\frac{\delta}{2} + i\text{sen}\frac{\delta}{2}\cos 2\theta & i\text{sen}\frac{\delta}{2}\text{sen} 2\theta \\ i\text{sen}\frac{\delta}{2}\text{sen} 2\theta & \cos\frac{\delta}{2} - i\text{sen}\frac{\delta}{2}\cos 2\theta \end{bmatrix}, \quad (2.33)$$

siendo $\delta = \delta_x - \delta_y$ y θ el ángulo al que se encuentra rotado el elemento polarizador. La Eq. 2.33 corresponde a la ecuación general para un retardador que genera un desfase δ entre las componentes de un haz incidente, y se encuentra rotado a un ángulo θ con respecto a un sistema de referencia, generalmente dado por el eje x del sistema de coordenadas. Finalmente, la matriz de Jones para un conjunto de retardadores está dado por el producto de las matrices de cada uno de ellos, como se presenta en la Eq. 2.34.

$$\mathbf{M}_{\mathbf{J}} = \mathbf{J}(\delta_N, \theta_N) * \mathbf{J}(\delta_{N-1}, \theta_{N-1}) * \dots * \mathbf{J}(\delta_2, \theta_2) * \mathbf{J}(\delta_1, \theta_1) = \prod_{m=1}^N \mathbf{J}(\delta_m, \theta_m), \quad (2.34)$$

donde los subíndices 1 y N corresponden al primer y último elemento con los que interactúa la luz en su trayecto.

2.5. Parámetros de Stokes

En 1852, George Gabriel Stokes (1819 - 1903) descubrió que el comportamiento de la polarización podía ser representado en términos de observables [6, 18]. Él encontró que cualquier estado de polarización de la luz podía ser representado en función de cuatro variables medibles, las cuales actualmente son conocidas como parámetros de Stokes. El primer parámetro corresponde a la intensidad del campo y los tres parámetros restantes indican el estado de polarización [5, 6].

2.5.1. Obtención de los parámetros de Stokes

Las altas frecuencias temporales que presentan los campos eléctricos y magnéticos imponen una dificultad al momento de realizar observaciones en tiempo real. En consecuencia, puede realizarse un promedio temporal sobre la función de la elipse de polarización, para obtener una expresión más sencilla de abordar, y que esté más acorde a los resultados que se pueden obtener mediante los sistemas de medición actuales. Recordemos la expresión de la elipse de polarización:

$$\frac{\langle E_x^2 \rangle}{E_{0y}^2} + \frac{\langle E_y^2 \rangle}{E_{0y}^2} - 2 \frac{\langle E_x E_y \rangle}{E_{0x} E_{0y}} \cos(\delta) = \text{sen}^2(\delta). \quad (2.35)$$

Para simplificar la Eq. 2.35, se le multiplica por $4E_{0x}^2 E_{0y}^2$,

$$4E_{0y}^2 \langle E_x^2(t) \rangle + 4E_{0x}^2 \langle E_y^2(t) \rangle - 8E_{0x} E_{0y} \langle E_x(t) E_y(t) \rangle \cos(\delta) = (2E_{0x} E_{0y} \text{sen} \delta)^2, \quad (2.36)$$

con:

$$\langle E_x^2(t) \rangle = \frac{1}{2} E_{0x}^2, \quad (2.37)$$

$$\langle E_y^2(t) \rangle = \frac{1}{2} E_{0y}^2, \quad (2.38)$$

$$\langle E_x(t)E_y(t) \rangle = \frac{1}{2}E_{0x}E_{0y}\cos(\delta). \quad (2.39)$$

Al sustituir las Eqs. 2.37, 2.38 y 2.39 en la Eq. 2.36:

$$2E_{0x}^2E_{0y}^2 + 2E_{0x}^2E_{0y}^2 - (2E_{0x}E_{0y}\cos(\delta))^2 = (2E_{0x}E_{0y}\sen(\delta))^2. \quad (2.40)$$

Una última simplificación se realiza al sumar y restar $E_{0x}^4 + E_{0y}^4$ en el lado izquierdo de la Eq. 2.40. Haciendo esto se obtienen cuadrados perfectos, llevando la expresión a la forma:

$$(E_{0x}^2 + E_{0y}^2)^2 - (E_{0x}^2 - E_{0y}^2)^2 - (2E_{0x}E_{0y}\cos(\delta))^2 = (2E_{0x}E_{0y}\sen(\delta))^2. \quad (2.41)$$

Cada uno de los términos de la Eq. 2.41 corresponde a un parámetro de Stokes, como se presenta en la Eq. 2.42,

$$\begin{aligned} S_0 &= E_{0x}^2 + E_{0y}^2, \\ S_1 &= E_{0x}^2 - E_{0y}^2, \\ S_2 &= 2E_{0x}E_{0y}\cos(\delta), \\ S_3 &= 2E_{0x}E_{0y}\sen(\delta), \end{aligned} \quad (2.42)$$

con,

$$S_0^2 = S_1^2 + S_2^2 + S_3^2.$$

Las ecuaciones obtenidas en Eq.2.42 son los parámetros de Stokes para una onda plana en términos de sus campos. Estos parámetro corresponden a la ubicación geométrica en el plano cartesiano, de un vector tridimensional definido dentro de la esfera de Poincaré⁵, la cual relaciona los parámetros de la elipse de polarización (la

⁵Esfera homológica, utilizada en óptica para la descripción de los parámetros de la elipse de

Eq. 2.20, la elipticidad e y el ángulo de orientación de la elipse ϕ) con los parámetros de Stokes [5–7].

A partir de los parámetros de Stokes es posible determinar algunas propiedades relacionadas con las características del estado de polarización descrito, entre los que se encuentran:

$$\begin{array}{ll}
 \text{Intensidad} & I = s_0; \\
 \text{Grado de polarización} & \text{DOP} = \frac{\sqrt{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}}{s_0}; \\
 \text{Grado de polarización lineal} & \text{DOLP} = \frac{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}}{s_0}; \\
 \text{Grado de polarización circular} & \text{DOCP} = \frac{s_3}{s_0}. \tag{2.43}
 \end{array}$$

El grado de polarización se encuentra definido en el intervalo $[0, 1]$, donde un $\text{DOP} = 1$ indica un haz completamente polarizado y $\text{DOP} = 0$ es luz despolarizada⁶. Cualquier vector de Stokes parcialmente polarizado ($\text{DOP} < 1$) \mathbf{S} , puede definirse como la superposición de un haz polarizado \mathbf{S}_p con un haz despolarizado \mathbf{S}_u , a través de la siguiente relación [19]:

$$\mathbf{S} = \mathbf{S}_p + \mathbf{S}_u = \begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix} = s_0 \text{DOP} \begin{bmatrix} s_0 \\ s_1/(s_0 \text{DOP}) \\ s_2/(s_0 \text{DOP}) \\ s_3/(s_0 \text{DOP}) \end{bmatrix} + (1 - \text{DOP})s_0 \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}.$$

También se pueden determinar las propiedades asociadas a la forma de la elipse de polarización, como lo son: los semiejes mayor y menor de la elipse (a, b), el ángulo de rotación del semieje mayor con respecto al eje x (ϕ) y la excentricidad (ϵ), relacionada

polarización a partir de una representación gráfica, que permite dar cuenta del grado de polarización de la luz.

⁶DOP = Grado de polarización por sus siglas en inglés (Degree Of Polarization).

al grado de similaridad entre una elipse y un círculo.

$$\begin{aligned}
 \text{Elipticidad} & \quad e = \frac{a}{b} = \frac{s_0}{s_0 + \sqrt{s_1^2 + s_2^2}}; \\
 \text{Orientación del semi eje mayor} & \quad \phi = \frac{1}{2} \arctan \left[\frac{s_2}{s_1} \right]; \\
 \text{Excentricidad} & \quad \varepsilon = \sqrt{1 - e^2}.
 \end{aligned}$$

Los vectores de Stokes para los estados de polarización degenerados se presentan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Vector de Stokes de los estados de polarización degenerados

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| $\mathbf{S}_{\text{LHP}} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ | $\mathbf{S}_{\text{LVP}} = \begin{bmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ | $\mathbf{S}_{\text{L+45P}} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix}$ |
| $\mathbf{S}_{\text{L-45P}} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \end{bmatrix}$ | $\mathbf{S}_{\text{RCPP}} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix}$ | $\mathbf{S}_{\text{LCP}} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{bmatrix}$ |

2.5.2. Matriz de Mueller

En 1943 Hans Mueller (1900-1965) desarrolló un método matricial para tratar con el vector de Stokes. La manera de aplicar las matrices de Mueller es análoga a la forma en que se trabaja con las matrices de Jones, y se puede definir como el operador matricial que transforma un vector de Stokes incidente \mathbf{S} en el estado \mathbf{S}' a la salida [5],

$$\mathbf{S}' = \begin{bmatrix} s'_0 \\ s'_1 \\ s'_2 \\ s'_3 \end{bmatrix} = \mathbf{MS} = \begin{bmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & m_{03} \\ m_{10} & m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{20} & m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{30} & m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix}. \quad (2.44)$$

La matriz \mathbf{M} conocida como matriz de Mueller, es un operador de 4×4 elementos reales. Al igual que con la matriz de Jones en el cálculo de Mueller es posible modelar tanto efectos de reflectancia como transmitancia, además de analizar procesos de esparcimiento los cuales están fuertemente asociados al fenómeno de la despolarización, el cual no puede abordarse a través del cálculo de Jones. La matriz de Mueller de un elemento óptico está compuesta por la superposición de las diferentes propiedades polarimétricas presentes en el medio, entre las que se incluyen la diatenuación, birrefringencia y despolarización, en cualquier base, lineal, circular o elíptica [20]. En la tabla 2.3 se presenta un compendio de las matrices de Mueller de los elementos polarimétricos más comunes.

Tal como en el cálculo de Jones, la matriz de Mueller de un elemento está orientada en la dirección de su eje rápido, por lo que para su implementación es necesario utilizar una matriz de rotación, que para el caso de una matriz de 4×4 viene dada por:

$$\mathbf{R}_M(\theta) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(2\theta) & -\text{sen}(2\theta) & 0 \\ 0 & \text{sen}(2\theta) & \cos(2\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}.$$

Además, análogo al cálculo de Jones, la matriz de Mueller de un conjunto de elementos puede ser calculada como el producto de las matrices de los elementos individuales, de manera similar al procedimiento presentado en la Eq. 2.34.

Tabla 2.3: Matrices de Mueller más comunes

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elemento no polarizador | | | |
| $\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$ | $\begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix}$ | $=$ | $\begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix}$ |
| Polarizador lineal, eje de transmisión en 0° | | | |
| $\frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$ | $\begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix}$ | $= \frac{1}{2}$ | $\begin{bmatrix} s_0 + s_1 \\ s_0 + s_1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ |
| Diatenuador lineal, eje en 0° , valores de transmitancia q,r | | | |
| $\frac{1}{2} \begin{bmatrix} q+r & q-r & 0 & 0 \\ q-r & q+r & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2\sqrt{qr} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2\sqrt{qr} \end{bmatrix}$ | $\begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix}$ | $= \frac{1}{2}$ | $\begin{bmatrix} q(s_0 + s_1) + r(s_0 - s_1) \\ q(s_0 + s_1) - r(s_0 - s_1) \\ 2s_2\sqrt{qr} \\ 2s_3\sqrt{qr} \end{bmatrix}$ |
| Diatenuador lineal, eje en θ , valores de transmitancia q,r | | | |
| $\frac{1}{2} \begin{bmatrix} q+r & (q-r)\cos 2\theta & (q-r)\sin 2\theta & 0 \\ (q-r)\cos 2\theta & (q+r)\cos^2 2\theta + 2\sqrt{qr}\sin^2 2\theta & (q+r-2\sqrt{qr}\sin 2\theta\cos 2\theta) & 0 \\ (q-r)\sin 2\theta & (q+r-2\sqrt{qr}\sin 2\theta\cos 2\theta) & (q+r)\sin^2 2\theta + 2\sqrt{qr}\cos^2 2\theta & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2\sqrt{qr} \end{bmatrix}$ | | | |
| Retardador lineal, eje rápido en 0° , retardo δ | | | |
| $\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \cos \delta & \sin \delta \\ 0 & 0 & -\sin \delta & \cos \delta \end{bmatrix}$ | $\begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix}$ | $=$ | $\begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \cos \delta + s_3 \sin \delta \\ -s_2 \sin \delta + s_3 \cos \delta \end{bmatrix}$ |
| Retardador lineal, eje rápido en θ , retardo δ | | | |
| $\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos^2 2\theta + \cos \delta \sin^2 2\theta & (1 - \cos \delta) \sin 2\theta \cos 2\theta & -\sin \delta \sin 2\theta \\ 0 & (1 - \cos \delta) \sin 2\theta \cos 2\theta & \sin^2 2\theta + \cos \delta \cos^2 2\theta & -\sin \delta \cos 2\theta \\ 0 & \sin \delta \sin 2\theta & -\sin \delta \cos 2\theta & \cos \delta \end{bmatrix}$ | | | |
| Despolarizador ideal | | | |
| $\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$ | $\begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix}$ | $=$ | $\begin{bmatrix} s_0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ |

2.6. Cálculo de la matriz de Mueller

Las matrices de Mueller y Jones que representan el efecto sobre la polarización de la luz introducido por un medio óptico, puede calcularse mediante la realización de un conjunto de medidas de intensidad en un polarimétero, que se compone de un generador de estados de polarización (PSG) y un analizador de estados de polarización (PSA), los cuales están compuestos por la combinación de láminas retardadoras de $\lambda/4$ y polarizadores. El primero genera un estado de polarización de referencia, mientras que el segundo permite analizar el estado de polarización de la luz luego de interactuar con el medio de interés [21]. La medida de intensidad para diferentes estados analizados por el PSA permite determinar el vector de Stokes de la luz, por ejemplo, para el caso de luz completamente polarizada es posible determinar el estado de polarización mediante la realización de 6 medidas:

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_H + I_V \\ I_H - I_V \\ I_P - I_M \\ I_R - I_L \end{bmatrix},$$

donde $I_H + I_V = I_P + I_M = I_R + I_L$ y cada termino corresponde a una intensidad medida, con el PSA dispuesto para polarización H = Horizontal, V = Vertical, P = $+45^\circ$, M = -45° , R = circular derecha y L = circular izquierda. El motivo por el que se utilizan estos 6 estados es porque son ortogonales entre sí y la simplicidad para generarlos. Antes de continuar con el procedimiento para medir la matriz de Mueller de un elemento, es apropiado exponer el método utilizado para determinar la disposición de los elementos que componen el PSG y PSA cuando se desea generar o analizar un estado de polarización determinado.

Polarimétero

El polarimétero es un instrumento óptico utilizado para determinar las propiedades polarimétricas de la luz y los cambios que los medios introducen sobre esta [20, 22].

Existe una gran diversidad de configuraciones para sistemas de polarimetría, los cuales cambian en función del tipo de medida que se desea realizar y la precisión deseada. Para realizar medias polarimétricas exactas, es necesario tener cuidado con las condiciones radiométricas del dispositivo, además de un buen control sobre la disposición de los componentes que lo conforman [16, 22]. En la Fig. 2-5 se presenta la configuración utilizada para muestras a transmisión utilizando un PSG y PSA completos, es decir, el sistema genera todos los estados de polarización degenerados además de estados elípticos.

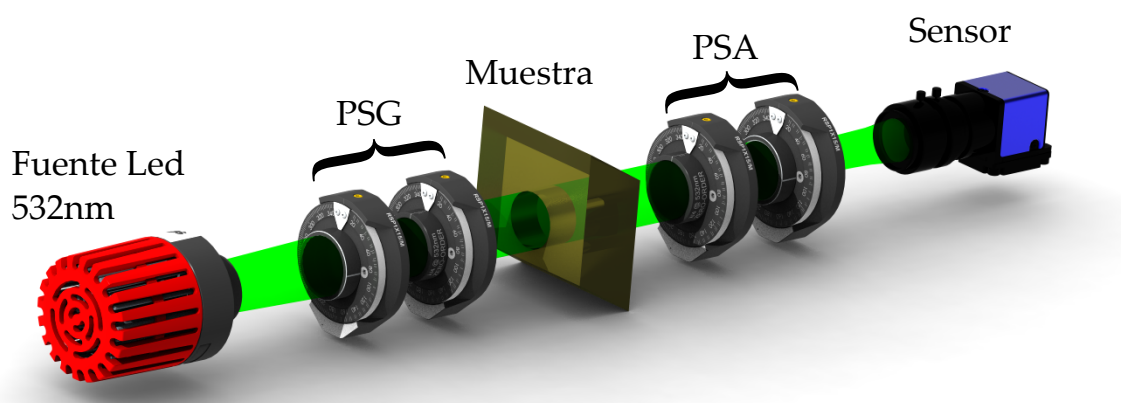


Figura 2-5: Modelo de un polarímetro a transmisión. El PSG está conformado por un polarizador seguido por un retardador de $\lambda/4$ y el PSA corresponde a un retardador de $\lambda/4$ seguido por un analizador.

En primer lugar se tiene una fuente, con un ancho espectral angosto (aproximadamente 5nm) y cuya longitud de onda central debe de coincidir con la reportada por el fabricantes de las láminas retardadoras, ya que las propiedades polarimétricas de los medios dependen de la longitud de onda. La disposición de los componentes acorde a la dirección de propagación de la luz es: fuente, PSG, muestra, PSA, sistema de medición de irradiancia (CCD, fotomultiplicador, potenciómetro). En el PSG los elementos a utilizar son un polarizador seguido de una lámina de $\lambda/4$ para una fuente despolarizada, para el caso de una fuente polarizada, el polarizador debe ser reemplazado por una lámina de $\lambda/2$. La configuración del PSA es una lámina de $\lambda/4$ seguida por un segundo polarizador, conocido como analizador. La mayoría de

los sistemas suelen incluir sistemas formadores de imagen, especialmente cuando se trabaja a reflexión o con fuentes parcialmente coherentes, ya que es necesario coleccionar la luz esparcida por la muestra.

Para entender como funcionan el PSG y PSA, evaluaremos las siguientes configuraciones:

$$\mathbf{QW}(-45^\circ)\mathbf{LP}(0^\circ)\mathbf{S} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} s_0 + s_1 \\ 0 \\ 0 \\ -s_0 - s_1 \end{bmatrix}, \quad (2.45)$$

$$\mathbf{LP}(0^\circ)\mathbf{QW}(45^\circ)\mathbf{S} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} s_0 - s_3 \\ s_0 - s_3 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (2.46)$$

$$\mathbf{QW}(-45^\circ)\mathbf{LP}(0^\circ)\mathbf{QW}(45^\circ)\mathbf{S} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} s_0 - s_3 \\ 0 \\ 0 \\ -s_0 + s_3 \end{bmatrix}, \quad (2.47)$$

donde $\mathbf{QW}(\theta)$ y $\mathbf{LP}(\theta)$ son una lámina de $\lambda/4$ y un polarizador lineal orientados en un ángulo θ con respecto al eje horizontal.

En la Eq. 2.45 se tiene el producto entre un haz con estado \mathbf{S} , que pasa a través de un polarizador orientado a 0° para luego pasar por una lámina de $\lambda/4$ orientada a -45° , configuración propia de un PSG. Para entender el efecto que tiene el PSG sobre el haz a la entrada, analicemos el estado resultante: dado que los elementos s_0 ($s_0 + s_1$)

y s_3 ($-s_0 - s_1$) del vector de Stokes generado poseen la misma magnitud pero signo contrario, podemos afirmar que esta configuración genera un haz con polarización circular izquierda (ver tabla 2.2). Por otro lado la intensidad del haz, $(s_0 + s_1)/2$, es proporcional a la componente de la luz polarizada linealmente en el eje horizontal (s_1), haciendo de esta configuración un analizador de polarización lineal horizontal.

En la Eq. 2.46 la luz pasa primero por la lámina retardadora y posteriormente por el polarizador, configurando un PSA. En este caso, la intensidad transmitida, $(s_0 - s_3)/2$, es proporcional al término $-s_3$ que indica polarización circular izquierda, es decir, si el haz incidente tiene polarización circular izquierda la intensidad medida será máxima, haciendo de este caso un analizador circular izquierdo. El arreglo de la Eq. 2.46 también corresponde a un polarizador lineal horizontal, ya que su último elemento es un polarizador sobre el eje x, donde la intensidad a la salida será proporcional a la componente circular del haz incidente.

La configuración presentada en la Eq. 2.47 corresponde a ambos, un polarizador circular izquierdo y un analizador circular izquierdo. Esta configuración se conoce como un polarizador circular izquierdo homogéneo [16], puesto que además de poder generar y analizar el mismo estado, presenta las mismas características indiferente a la dirección de propagación del haz.

Cálculo de la matriz de Mueller mediante imágenes polarimétricas

Una imagen polarimétrica se define como la distribución de intensidad obtenida en un polarímetro, para cada configuración del PSG-PSA [21]. Debido a que el cálculo de Mueller-Stokes se basa en la realización de medidas de intensidad, se han diseñado diferentes modelos, mediante los cuales es posible realizar un conjunto de operaciones aritméticas a partir medidas de intensidad, para así determinar los elementos que componen la matriz de Mueller de una muestra. Con el fin de analizar esta afirmación evaluamos el caso del elemento m_{00} , el cual puede entenderse como un término de normalización en la matriz. En el caso de un elemento que presente absorbanza, diatenuación, despolarización y birrefringencia, m_{00} viene dado por:

$$m_{00} = a(q + r),$$

donde a es el coeficiente de atenuación de la muestra, q y r están definidos en el intervalo $[0, 1]$ y son las transmitancias del elemento en una base ortogonal, ya sea lineal horizontal-vertical o circular derecha-izquierda. Como se observa, el término m_{00} no depende de la diferencia de fase entre las componentes $x - y$ del campo, únicamente de los cambios en la magnitud de la intensidad transmitida por la muestra. En consecuencia, es posible asumir que el elemento m_{00} puede determinarse a través de comparar un par de estados ortogonales en el PSG-PSA. Para ejemplificar esta idea, tomemos los estados lineal horizontal y lineal vertical:

$$\mathbf{PSG}(\mathbf{H}) = \mathbf{PSA}(\mathbf{H}) = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{PSG}(\mathbf{V}) = \mathbf{PSA}(\mathbf{V}) = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix},$$

al realizar el producto $\mathbf{S}' = \mathbf{PSA} * \mathbf{M} * \mathbf{PSG} * \mathbf{S}$ para cada una de las 4 posibles combinaciones generador-analizador, HH, HV, VH, VV, se obtienen las medidas de intensidad de la muestra en cada combinación. \mathbf{M} y \mathbf{S} son las definiciones de la matriz de Mueller y el vector de Stokes presentados en la Eq. 2.44.

$$\begin{aligned}
I_{HH} &= \frac{\mathbf{m}_{00}(s_0 + s_1)}{4} + \frac{\mathbf{m}_{01}(s_0 + s_1)}{4} + \frac{\mathbf{m}_{10}(s_0 + s_1)}{4} + \frac{\mathbf{m}_{11}(s_0 + s_1)}{4}, \\
I_{HV} &= \frac{\mathbf{m}_{00}(s_0 + s_1)}{4} + \frac{\mathbf{m}_{01}(s_0 + s_1)}{4} - \frac{\mathbf{m}_{10}(s_0 + s_1)}{4} - \frac{\mathbf{m}_{11}(s_0 + s_1)}{4}, \\
I_{VH} &= \frac{\mathbf{m}_{00}(s_0 - s_1)}{4} - \frac{\mathbf{m}_{01}(s_0 - s_1)}{4} + \frac{\mathbf{m}_{10}(s_0 - s_1)}{4} - \frac{\mathbf{m}_{11}(s_0 - s_1)}{4}, \\
I_{VV} &= \frac{\mathbf{m}_{00}(s_0 - s_1)}{4} - \frac{\mathbf{m}_{01}(s_0 - s_1)}{4} - \frac{\mathbf{m}_{10}(s_0 - s_1)}{4} + \frac{\mathbf{m}_{11}(s_0 - s_1)}{4}.
\end{aligned} \tag{2.48}$$

Al realizar la suma de las expresiones presentadas en la Eq. 2.48 se obtiene:

$$I_{HH} + I_{HV} + I_{VH} + I_{VV} = \mathbf{m}_{00}s_0 + \mathbf{m}_{01}s_1,$$

de donde se despeja \mathbf{m}_{00} :

$$\mathbf{m}_{00} = (I_{HH} + I_{HV} + I_{VH} + I_{VV} - \mathbf{m}_{01}s_1)/s_0. \tag{2.49}$$

La Eq. 2.49 depende de las medidas de intensidad para 4 estados, además de los parámetros \mathbf{m}_{01} , s_0 y s_1 , los cuales pueden ser ignorados bajo ciertas consideraciones: s_0 y s_1 son un par de parámetros del vector de Stokes asociados al estado de polarización de la luz, los cuales por conveniencia y sin riesgo de perder generalidad se toman con el valor 1. En términos generales, $\mathbf{m}_{01} = \mathbf{a}(\mathbf{q} - \mathbf{r})$, esto indica que para un medio sin diatenuación $\mathbf{q} = \mathbf{r}$ y $\mathbf{m}_{01} = 0$. Si el medio presenta diatenuación como en el caso de un polarizador, \mathbf{m}_{01} introducirá un cambio en la magnitud de \mathbf{m}_{00} , el cual debe ser tomado en consideración en el resto de las medidas, por ello, una vez calculada la matriz de Mueller de una muestra, la matriz debe normalizarse dividiendo por \mathbf{m}_{00} .

De manera análoga se realiza el análisis para cada uno de los demás elementos de la matriz Mueller, que pueden ser determinados mediante diferentes combinaciones de medidas de intensidad. La totalidad de los elementos de la matriz de Mueller pueden ser calculados utilizando 16, 36 o 49 imágenes polarimétricas, donde 36 y 49 medidas generan un sistema sobredeterminado. Esto reduce el error asociado al ruido y a la precisión de los elementos polarimétricos utilizados para la medición [23, 24], ya que

al tomar más medidas, los cambios aleatorios asociados al ruido se ven promedian en el cálculo final. Las Eqs. 2.50, 2.51 presentan la expresión para el cálculo de la matriz de Mueller con 16 y 36 medidas respectivamente.

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} \text{HH} + \text{HV} + \text{VH} + \text{VV} & \text{HH} + \text{HV} - \text{VH} - \text{VV} & 2\text{PH} + 2\text{PV} - m_{00} & 2\text{RH} + 2\text{RV} - m_{00} \\ \text{HH} - \text{HV} + \text{VH} - \text{VV} & \text{HH} - \text{HV} - \text{VH} + \text{VV} & 2\text{PH} - 2\text{PV} - m_{10} & 2\text{RH} - 2\text{RV} - m_{10} \\ 2\text{HP} + 2\text{VP} - m_{00} & 2\text{HP} - 2\text{VP} - m_{01} & 4\text{PP} - 2\text{PH} - 2\text{PV} - m_{20} & 4\text{RP} - 2\text{RH} - 2\text{RV} - m_{20} \\ 2\text{HR} + 2\text{VR} - m_{00} & 2\text{HR} - 2\text{VR} - m_{01} & 4\text{PR} - 2\text{PH} - 2\text{PV} - m_{30} & 4\text{RR} - 2\text{RH} - 2\text{RV} - m_{30} \end{bmatrix}. \quad (2.50)$$

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} \text{HH} + \text{HV} + \text{VH} + \text{VV} & \text{HH} + \text{HV} - \text{VH} - \text{VV} & \text{PH} + \text{PV} - \text{MH} - \text{MV} & \text{RH} + \text{RV} - \text{LH} - \text{LV} \\ \text{HH} - \text{HV} + \text{VH} - \text{VV} & \text{HH} - \text{HV} - \text{VH} + \text{VV} & \text{PH} - \text{PV} - \text{MH} + \text{MV} & \text{RH} - \text{RV} - \text{LH} + \text{LV} \\ \text{HP} - \text{HM} + \text{VP} - \text{VM} & \text{HP} - \text{HM} - \text{VP} + \text{VM} & \text{PP} - \text{PM} - \text{MP} + \text{MM} & \text{RP} - \text{RM} - \text{LP} + \text{LM} \\ \text{HR} - \text{HL} + \text{VR} - \text{VL} & \text{HR} - \text{HL} - \text{VR} + \text{VL} & \text{PR} - \text{PL} - \text{MR} + \text{ML} & \text{LL} - \text{RL} - \text{LR} + \text{RR} \end{bmatrix}. \quad (2.51)$$

Para cada término presente en las matrices, la primera sigla representa el estado de polarización a la entrada y la segunda el estado de polarización analizado. Se ha utilizado el sistema de referencia propuesto por Hecht [7].

2.6.1. Método de descomposición polar

Para muchas aplicaciones es importante no solo conocer la matriz de Mueller del elemento, sino caracterizar sus propiedades polarimétricas como la diatenuación, la despolarización y el retardo de fase. Cuando un medio se limita únicamente a efectos de diatenuación y retardo de fase, el método de descomposición propuesto por Gil y Bernabeu [25], permite calcular las matrices de diatenuación y retardo de fase como el producto de dos matrices asociadas a cada efecto polarimétrico,

$$\mathbf{M} = \mathbf{M}_R * \mathbf{M}_D,$$

donde \mathbf{M}_R es la matriz de un retardador de fase homogéneo, y \mathbf{M}_D es la matriz de un diatenuador homogéneo. Teniendo en cuenta que no hay efectos de despolarización, es posible aplicar el método de descomposición de Gil y Bernabeu tanto en la notación

de Mueller como en la de Jones. Cuando un elemento presenta despolarización, no es posible realizar análisis mediante la notación de Jones, donde no tiene dentro de consideración dicho efecto, y como consecuencia no hay una relación directa entre las matrices de Jones y Mueller del elemento [5, 16, 20].

En presencia de efectos de despolarización es necesario utilizar el cálculo de Mueller, además del método de descomposición propuesto por Lu y Chipman [26], basado en el método de descomposición polar y funciona como una forma generalizada de la propuesta de Gil y Bernabeu, al incluir una matriz de despolarización,

$$[\mathbf{M}] = [\mathbf{M}_\Delta] \cdot [\mathbf{M}_R] \cdot [\mathbf{M}_D],$$

donde las matrices $[\mathbf{M}_\Delta]$, $[\mathbf{M}_R]$, $[\mathbf{M}_D]$ están respectivamente asociadas a un despolarizador, un retardador y un diatenuador. En la formulación de Lu y Chipman, la matriz de Mueller general de un elemento puede definirse como:

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{D}^T \\ \mathbf{P} & \mathbf{m} \end{bmatrix},$$

donde \mathbf{D}^T es la transpuesta del vector de diatenuación, \mathbf{P} es el vector de polarización y \mathbf{m} es una submatriz de 3×3 elementos que contiene los efectos de despolarización, retardo y diatenuación de la matriz original. Para separar todas las propiedades polarimétricas de una matriz de Mueller \mathbf{M} , se inicia por modelar un diatenuador simétrico a partir de la matriz original, desde las Eqs. 2.52, 2.53 y 2.54

$$\mathbf{M}_D = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{D}^T \\ \mathbf{D} & \mathbf{m}_D \end{bmatrix}, \quad (2.52)$$

$$\mathbf{m}_D = \sqrt{1 - D^2} \mathbf{I} + (1 - \sqrt{1 - D^2}) \hat{\mathbf{D}} \hat{\mathbf{D}}^T, \quad (2.53)$$

$$\mathbf{D} = \frac{1}{m_{00}} \begin{bmatrix} m_{01} \\ m_{02} \\ m_{03} \end{bmatrix}, \quad (2.54)$$

donde \mathbf{m}_D es una sub matriz de 3×3 elementos, construida en términos del vector de diatenuación de la matriz de Mueller original (Eq. 2.54) y la matriz identidad $\mathbf{I}(3)$, D es la norma del vector de diatenuación \mathbf{D} , y $\hat{\mathbf{D}}$ el vector de diatenuación normalizado. Ahora, es posible realizar el producto entre la matriz de Mueller total y la inversa de la matriz de diatenuación, para calcular una nueva matriz $\mathbf{M}' = \mathbf{M}\mathbf{M}_D^{-1}$. Esta nueva matriz \mathbf{M}' no tendrá efectos de diatenuación, es decir, constará de un retardador y un despolarizador. La nueva matriz \mathbf{M}' puede describirse como:

$$\mathbf{M}' = \mathbf{M}_\Delta \mathbf{M}_R = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{0}^T \\ \mathbf{P}_\Delta & \mathbf{m}_\Delta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{0}^T \\ \mathbf{0} & \mathbf{m}_R \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{0}^T \\ \mathbf{P}_\Delta & \mathbf{m}_\Delta \mathbf{m}_R \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{0}^T \\ \mathbf{P}_\Delta & \mathbf{m}' \end{bmatrix}, \quad (2.55)$$

$$\mathbf{P}_\Delta = \frac{\mathbf{P} - \mathbf{m}\mathbf{D}}{1 - D^2}, \quad (2.56)$$

$$\mathbf{P} = \frac{1}{m_{00}} \begin{bmatrix} m_{10} \\ m_{20} \\ m_{30} \end{bmatrix}. \quad (2.57)$$

En la Eq. 2.55, $\mathbf{0}$ representa un vector columna de ceros y \mathbf{P}_Δ es un vector dado por la Eq. 2.56, calculado a partir del vector de polarización descrito en la Eq. 2.57. Para calcular la matriz de despolarización \mathbf{M}_Δ , es necesario determinar \mathbf{m}_Δ ,

$$\begin{aligned} \mathbf{m}_\Delta = & \pm \left[\mathbf{m}' (\mathbf{m}')^T + \left(\sqrt{\lambda_1 \lambda_2} + \sqrt{\lambda_2 \lambda_3} + \sqrt{\lambda_3 \lambda_1} \right) \mathbf{I} \right]^{-1} \\ & \times \left[\left(\sqrt{\lambda_1} + \sqrt{\lambda_2} + \sqrt{\lambda_3} \right) \mathbf{m}' (\mathbf{m}')^T + \sqrt{\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3} \mathbf{I} \right], \end{aligned} \quad (2.58)$$

donde λ_1 , λ_2 y λ_3 son los autovalores de $\mathbf{m}'(\mathbf{m}')^T$. En la Eq. 2.58, se utiliza signo negativo cuando el determinante de \mathbf{m}' es negativo, en cualquier otro caso se emplea el signo positivo. Mediante las Eqs. 2.56 y 2.58 se determina la matriz de despolarización \mathbf{M}_Δ , con la cual calcula la matriz de retardo a partir de,

$$\mathbf{M}_R = \mathbf{M}_\Delta^{-1} \mathbf{M}' = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{0}^T \\ \mathbf{0} & \mathbf{m}_R \end{bmatrix}.$$

2.7. Interpretación de las propiedades polarimétricas de la matriz de Mueller

Como se ha presentado hasta este punto, tanto el estado de polarización de la luz como las propiedades ópticas de los medios pueden ser modeladas a través de métodos matriciales. Debido a su capacidad de modelar efectos de despolarización, el cálculo de Mueller-Stokes se presentará como un caso más general que el cálculo de Jones, y se evaluará su significado físico para cada una de las propiedades ópticas frecuentemente evaluadas en medios.

2.7.1. Validez física de la matriz de Mueller

Por definición una matriz de Mueller es un operador de 4×4 elementos reales que actúa sobre un vector de Stokes. Sin embargo, dicha afirmación no es suficiente para que esta represente un elemento físico. Una matriz de Mueller que al operar sobre un vector de Stokes incidente, produce un vector con un grado de polarización mayor que uno ($s_0^2 < s_1^2 + s_2^2 + s_3^2$) no puede considerarse un elemento físico, ya que no es posible generar físicamente un haz con un grado de polarización mayor a la unidad. De igual forma, no es posible generar un haz cuya intensidad (s_0) sea negativa. Muchos autores han evaluado los requerimientos necesarios para que una matriz de Mueller represente un elemento físico [27, 28], sin embargo, a la fecha no existe un conjunto de condiciones que describan de manera exacta la validez física de una matriz de Mueller. No obstante, las siguientes restricciones han sido identificadas como necesarias para

que una matriz de Mueller represente un elemento físico:

$$\text{Tr}(\mathbf{M}\mathbf{M}^T) \leq 4m_{00}^2, \quad (2.59)$$

$$m_{00}^2 \geq |m_{ij}|, \quad (2.60)$$

$$m_{00}^2 \geq b^2, \quad (2.61)$$

$$(m_{00} - b)^2 \geq \sum_{j=1}^3 \left(m_{0,j} - \sum_{k=1}^3 m_{j,k} a_k \right), \quad (2.62)$$

donde Tr es la traza de una matriz, $b = \sqrt{m_{01}^2 + m_{02}^2 + m_{03}^2}$, $a_k = m_{0,k}/b$, y los subíndices i, j, k corresponden a los elementos de la matriz de Mueller. Para las matrices de un polarizador ideal, un analizador ideal, y otros elementos sin despolarización, se cumplen las igualdades de las Eqs. 2.59 a 2.60. Así, una pequeña cantidad de ruido en las medidas utilizadas para la caracterización de un polarizador o un retardador, pueden llevar a una matriz sin validez física.

2.7.2. Diatenuación

Como se expresó en la Eq. 2.26, la diatenuación introducida por un medio se calcula como: $(I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min})$. Siendo I_{\max} e I_{\min} las intensidades máxima y mínima medidas a transmisión uo reflexión para un par de estados ortogonales. Se calcula un valor promedio sobre dichas intensidades, para de esta forma determinar I_{\max} e I_{\min} en función de los elementos de la matriz de Mueller.

$$I_{\max} = m_{00} + \sqrt{m_{01}^2 + m_{02}^2 + m_{03}^2}, \quad I_{\min} = m_{00} - \sqrt{m_{01}^2 + m_{02}^2 + m_{03}^2}. \quad (2.63)$$

Tomando la definición de diatenuación (Eq. 2.26) y reemplazando las expresiones de la Eq. 2.63 obtiene la diatenuación $D(\mathbf{M})$ para una matriz de Mueller.

$$D(\mathbf{M}) = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} = \frac{\sqrt{m_{01}^2 + m_{02}^2 + m_{03}^2}}{m_{00}}. \quad (2.64)$$

Cuando $D(\mathbf{M}) = 1$, el elemento descrito es un polarizador ideal que bloquea completamente una componente del haz de entrada, y solamente un haz con el estado de polarización ortogonal puede transmitido (o reflejado). Cuando $D(\mathbf{M}) = 0$, todos los posibles estados de entrada tienen la misma transmitancia en el medio. La diatenuación también puede definirse como la norma del vector de diatenuación (Eq. 2.54).

2.7.3. Polarizancia

Por definición la polarizancia de un medio corresponde a su capacidad para incrementar el grado de polarización de un haz despolarizado [16]. Matemáticamente, este concepto puede ser expresado como:

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} m_{00} \\ m_{10} \\ m_{20} \\ m_{30} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & m_{03} \\ m_{10} & m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{20} & m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{30} & m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}.$$

Aplicando la definición de grado de polarización presentada en la Eq. 2.43 sobre el vector \mathbf{S}' obtenemos la definición de polarizancia para una matriz de Mueller, la cual vienen dada por:

$$P(\mathbf{M}) = \frac{\sqrt{m_{01}^2 + m_{02}^2 + m_{03}^2}}{m_{00}}.$$

La polarizancia también puede calcularse como la norma del vector de polarizancia (Eq. 2.57). En presencia de inhomogeneidad o despolarización, la polarizancia siempre será menor que uno.

2.7.4. Despolarización

La matriz que describe un despolarizador general, también llamado despolarizador variable, viene dada por:

$$\mathbf{M}_{\Delta} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{a} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{b} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \mathbf{c} \end{bmatrix},$$

donde \mathbf{a} , \mathbf{b} y \mathbf{c} son los factores de polarización del medio para los elementos s_1 , s_2 y s_3 de un vector de entrada respectivamente. Para un despolarizador perfecto \mathbf{a} , \mathbf{b} y \mathbf{c} son cero, y en un elemento no-despolarizador son uno. Para describir la despolarización de una matriz de Mueller se usa una expresión basada en la semejanza entre la matriz de Mueller y un elemento no-despolarizador, la cual se define como:

$$\Delta = 1 - \frac{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^4 m_{i,i}^2\right) - m_{00}^2}}{\sqrt{3}m_{00}},$$

donde $m_{i,j}$ son los elementos de la matriz de Mueller a analizar y $\sqrt{3}$ es un factor de normalización. De esta forma si $\Delta = 0$, dicho elemento será no-despolarizador.

2.7.5. Retardancia

La retardancia se refiere a la capacidad de un medio para generar una diferencia de fase o retardo entre un par de estados ortogonales [5]. Esta se calcula a partir de la matriz de retardo obtenida mediante el método de descomposición polar, la cual corresponde a la matriz de un retardador homogéneo (ver tabla 2.3). De esta forma el retardo R introducido por el elemento representado por la matriz de Mueller viene dado por:

$$R = \cos^{-1} \left(\frac{\text{Tr}(\mathbf{M}_{\mathbf{R}})}{2} - 1 \right).$$

2.7. INTERPRETACIÓN DE LAS PROPIEDADES POLARIMÉTRICAS DE LA MATRIZ DE MUELLEN

El retardo R también se conoce como desfase entre componentes y se define en términos de la birrefringencia como: $R = 2\pi\Delta n d/\lambda$, donde d es la distancia recorrida por la luz a través del medio y λ es la longitud de onda del haz.

Referencias

- [1] V.C. Olguín. *Física: principios con aplicaciones*. Pearson Educación, 2006. [42](#)
- [2] W. Tomasi, G.M. Hernández, and V.G. Pozo. *Sistemas de comunicaciones electrónicas*. Pearson Educación, 2003. [42](#), [44](#)
- [3] M. Born, E. Wolf, and et al. *Principles of optics : electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. Cambridge University Press, 7th expanded edition, 1999. [43](#), [44](#)
- [4] K. Zhang and D. Li. *Electromagnetic Theory for Microwaves and Optoelectronics*. Springer Berlin Heidelberg, 2013. [43](#)
- [5] E. Collett. *Field guide to polarization*. Number v. FG05 in SPIE field guides. SPIE Press, Bellingham, Wash, 2005. [45](#), [49](#), [52](#), [54](#), [55](#), [56](#), [58](#), [60](#), [61](#), [71](#), [76](#)
- [6] D. H. Goldstein. *Polarized Light.pdf*. Taylor & Francis Group, United States, 3rd edition, 2011. [45](#), [46](#), [47](#), [49](#), [54](#), [58](#), [60](#)
- [7] E. Hecht. *Optics*. Addison Wesley, 1301 Sonsomen St., San Francisco, United States, 4th. edition, 2002. [45](#), [47](#), [52](#), [53](#), [54](#), [60](#), [70](#)
- [8] S. Echeverri. Generacion y Caracterizacion de Vortices Opticos Mediante Moduladores Espaciales de Luz. Master's thesis, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia, 2015. [47](#), [48](#), [49](#)
- [9] J. Beutel, H.L. Kundel, and R.L. Van Metter. *Handbook of Medical Imaging: Physics and psychophysics*. Handbook of Medical Imaging. SPIE Press, 2000. [50](#)

- [10] E. Garcia-Caurel, R. Ossikovski, M. Foldyna, A. Pierangelo, A. De Martino, and B. Drévilion. Advanced Mueller Ellipsometry Instrumentation and Data Analysis. In Springer, editor, *Ellipsometry at the nanoscale*, Engineering, page 31. Springer, February 2013. [50](#), [51](#), [53](#)
- [11] B. R. Singh, M. P. Fuller, and G. Schiavo. Molecular structure of tetanus neurotoxin as revealed by Fourier transform infrared and circular dichroic spectroscopy. *Biophysical Chemistry*, **36**(2):155 – 166, 1990. [52](#)
- [12] T. Luo and K. L. Kiick. Collagen like peptides and peptide polymer conjugates in the design of assembled materials. *European Polymer Journal*, **49**(10):2998 – 3009, 2013. [52](#)
- [13] P. Theocaris and E. Gdoutos. *Matrix Theory of Photoelasticity*, volume 11 of *Springer Series in Optical Sciences*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1979. [52](#)
- [14] B. Wang, A. Leadbetter, J. Freudenthal, B. Seipel, and H. Seigneur. Measuring Stress Birefringence in Small Si Samples. *Energy Procedia*, **55**(Supplement C):608 – 617, 2014. [52](#)
- [15] J.J. Gil and E. Bernabeu. Depolarization and polarization indices of an optical system. *Optica Acta: International Journal of Optics*, **33**(2):185–189, 1986. [53](#)
- [16] E. Garcia-Caurel, R. Ossikovski, M. Foldyna, A. Pierangelo, B. Drévilion, and A. De Martino. Advanced Mueller Ellipsometry Instrumentation and Data Analysis. In Maria Losurdo and Kurt Hingerl, editors, *Ellipsometry at the Nanoscale*, pages 31–143. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-33956-1_2. [53](#), [65](#), [67](#), [71](#), [75](#)
- [17] J.R. García, J.M. Virgós, and J.M.V. Rovira. *Fundamentos de óptica ondulatoria*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo, 1999. [54](#)
- [18] K. Barnham, C. Chambers, N. Hunter, and E. Labrecque. *Science Biographies*. Raintree Perspectives: Science Biographies. Heinemann-Raintree, 2014. [58](#)

- [19] E. Collett. *Polarized light. Fundamentals and applications*. Optical Engineering. Michigan University Press, New York, Dekker, United States, 1992. [60](#)
- [20] M. Bass and Optical Society of America, editors. *Handbook of optics. Vol. 2: Devices, measurements, and properties*. McGraw-Hill, New York, NY, 2nd. edition, 1995. [62](#), [64](#), [71](#)
- [21] A. Márquez, I. Moreno, C. Iemmi, A. Lizana, J. Campos, and M. J. Yzuel. Mueller-Stokes characterization and optimization of a liquid crystal on silicon display showing depolarization. *Optics express*, **16**(3):1669–1685, 2008. [64](#), [67](#)
- [22] H. Wei-Liang, M. Graham, B. Kaushik, B. Neal, I. Mohammed, and P. Stanley. Full-stokes imaging polarimeter using an array of elliptical polarizer. *Opt. Express*, **22**(3):3063–3074, Feb 2014. [64](#), [65](#)
- [23] L.V. Wang and H. Wu. *Biomedical Optics: Principles and Imaging*. Wiley, 2012. [69](#)
- [24] S.D. Gupta, N. Ghosh, and A. Banerjee. *Wave Optics: Basic Concepts and Contemporary Trends*. CRC Press, 2015. [69](#)
- [25] J. J. Gil and E. Bernabeu. Obtainment of the polarizing and retardation parameters of a non-depolarizing optical system from the polar decomposition of its mueller matrix. *Optik*, **76**:67–71, 01 1987. [70](#)
- [26] S. Lu and R. A. Chipman. Generalized diattenuation and retardance for inhomogeneous polarization elements. *Proc.SPIE*, 1746:1746 – 1746 – 4, 1992. [71](#)
- [27] C. V. M. Van der Mee and J. W. Hovenier. Structure of matrices transforming Stokes parameters. *Journal of mathematical physics*, **33**(10):3574–3584, 1992. [73](#)
- [28] M. S. Kumar and R. Simon. Characterization of Mueller matrices in polarization optics. *Optics Communications*, **88**(4):464 – 470, 1992. [73](#)

Capítulo 3

Evaluación de los métodos polarimétricos: Caso de birrefringencia por esfuerzo

Antes de evaluar muestras biológicas, las cuales se caracterizan por generar esparcimiento sobre la luz, es recomendable implementar los algoritmos y métodos de polarimetría en una muestra más fácil de controlar y analizar, las cuales presenten únicamente retardo de fase. En este capítulo se presenta un primer acercamiento a la implementación de métodos polarimétricos, mediante el análisis del fenómeno de birrefringencia por esfuerzo. Se analizará una ventana óptica sometida a cargas térmicas y mecánicas, y se evaluarán las propiedades del elemento, mediante los métodos polarimétricos presentados en el Capítulo 2. Posteriormente se compararán los resultados obtenidos mediante simulaciones basadas en el fenómeno de la fotoelasticidad.

3.1. Birrefringencia por esfuerzo

La birrefringencia también puede ser observada en determinados materiales nacristalinos que en principio son ópticamente isotrópicos, pero al ser sometidos a un esfuerzo presentan birrefringencia temporal, llamada así en 1816 por Sr. David Brewster (1781-1868) [1, 2], al observar que este fenómeno únicamente se presentaba

mientras el material estuviera sometido al esfuerzo, una vez el esfuerzo desaparecía la birrefringencia también.

Veinticinco años después Franz Ernst Neumann (1798-1895) retomó el estudio de la birrefringencia temporal, y llegó a la conclusión de que la causa de los cambios en los índices de refracción era debido a las deformaciones en el material [1, 2]. Once años después, Maxwell, probablemente en desconocimiento de los estudios realizados por Neumann, estudió el fenómeno de la birrefringencia temporal y atribuyó los cambios en los índices de refracción a los esfuerzos principales en el material [1].

Ambos modelos, tanto el de Neumann como el de Maxwell están basados en el caso de una deformación elástica, en la cual existe una relación lineal entre deformación y esfuerzo. Es posible deducir las ecuaciones de Maxwell a partir de la formulación de Neumann o viceversa utilizando la ley de Hooke [3], por lo cual no es posible determinar si la birrefringencia temporal se debe a una deformación o esfuerzo, pero para fines prácticos, ambos son aplicables.

3.1.1. Esfuerzos mecánicos y la elipsoide de Fresnel

Cuando un objeto se encuentra sometido a una carga externa, se genera una distribución de tensiones internas sobre su geometría, representada matemáticamente a través de un tensor de esfuerzos o tensor tensión [4]. Una forma de modelar un objeto es través de subdominios más pequeños, que describen el comportamiento del medio a través de pequeños diferenciales, permitiendo así, muestrear los esfuerzos a lo largo de todo el volumen. El tensor a calcular para cada elemento está dado por la siguiente expresión:

$$\mathbb{T} = \begin{bmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & \sigma_{13} \\ \sigma_{21} & \sigma_{22} & \sigma_{23} \\ \sigma_{31} & \sigma_{32} & \sigma_{33} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{bmatrix}, \quad (3.1)$$

donde σ se refiere a los esfuerzos normales y cortantes del elemento (ver Fig. 3-1(a)). El tensor presentado en la Eq. 3.1 puede ser diagonalizado para obtener los

esfuerzos principales del sistema y sus direcciones con respecto al sistema de referencia inicial [5, 6]. Los esfuerzos principales $(\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3)$ son una representación del tensor de esfuerzos, en donde se rota su sistema coordinado a uno definido por las direcciones principales del tensor, tal como se presenta en la Fig. 3-1(b). De esta manera, se definen los esfuerzos que actúan sobre un elemento únicamente a partir de esfuerzos normales. Los autovalores y autovectores del tensor de esfuerzo, corresponden a los esfuerzos principales y vectores unitarios que describen su dirección, respectivamente [5, 6].

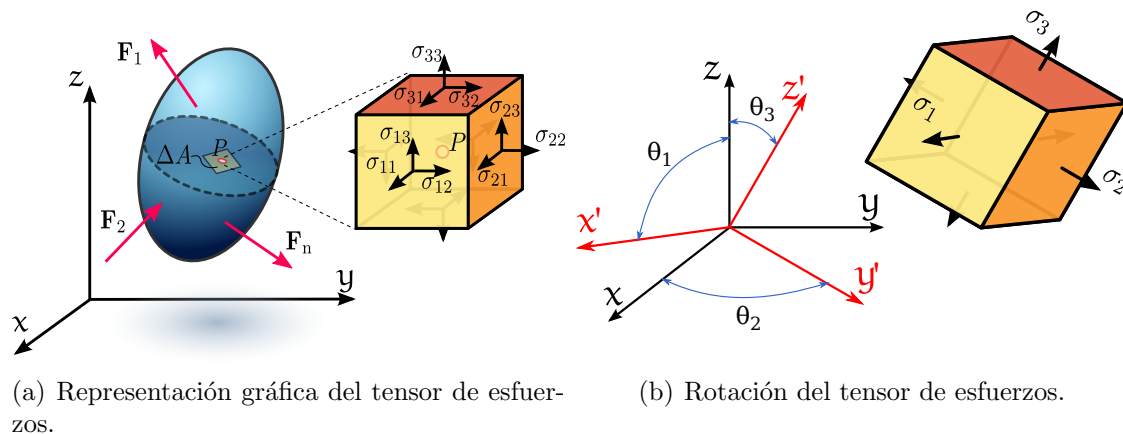


Figura 3-1: Representación gráfica de un tensor de esfuerzos y cálculo de esfuerzos principales.

El tensor de esfuerzos principales puede ser modelado gráficamente como un elipsoide, donde la dirección de sus ejes corresponde a las direcciones principales del tensor, también llamados cosenos directores, y la magnitud de sus semiejes es proporcional al valor de sus esfuerzos principales en cada eje. Dicha representación recibe el nombre de elipsoide de Cauchy. De manera similar se calcula y modela un tensor de deformaciones, no obstante, debido a que los modelos propuestos por Neumann y Maxwell se basan en una deformación elástica, las direcciones principales del tensor de esfuerzo y deformación son las mismas[1].

Elipsoide de Fresnel

La elipsoide de Fresnel permite dar una interpretación geométrica de las propiedades ópticas de un material, al definir los índices de refracción del medio como los semiejes de una elipse. Su interpretación es análoga a la de la elipsoide de Cauchy, donde la dirección de los ejes concuerda con la orientación de los ejes principales del elemento [7]. A partir de la teoría de interacción entre ondas electromagnéticas con medios, se sabe que el índice de refracción de un material que no presenta propiedades magnéticas depende de su permitividad dieléctrica relativa, y esta a su vez de la composición y distribución estructural del medio [8].

La birrefringencia producida mecánicamente en un material isotrópico tiene su origen en los cambios estructurales inducidos en el cuerpo por estrés o deformaciones. El estrés o la tensión causan variaciones intermoleculares de la estructura del cuerpo, que alteran su carácter ópticamente isotrópico [1]. En el caso de las deformaciones elásticas, en las que coinciden los ejes principales de los elipsoides de tensión y deformación, es razonable concluir que los ejes del elipsoide del índice de refracción de Fresnel y los elipsoides de esfuerzo y tensión de Cauchy son coaxiales.

Bajo esta definición, un material en principio isotrópico se representa a través de una esfera en la que indiferente de la orientación de sus ejes principales, su valor, el cual corresponde al índice de refracción del medio, es igual para cualquier dirección de incidencia y polarización de la luz. Al ser sometido a un esfuerzo, dicha esfera se convertirá en una elipsoide, tal como se presenta en la Fig. 3-2, en cuyo caso dependiendo el ángulo de incidencia de la luz y su estado de polarización se tendrá un índice de refracción diferente.

3.1.2. Ley de estrés óptico

A partir de la coaxialidad entre las elipsoides de Fresnel y Cauchy, se asume la existencia de una relación de proporcionalidad entre los índices de refracción definidos por la elipsoide de Fresnel con los esfuerzos y deformaciones definidos por la de Cauchy. Haciendo referencia a un mismo sistema coordenado, se expresan las corres-

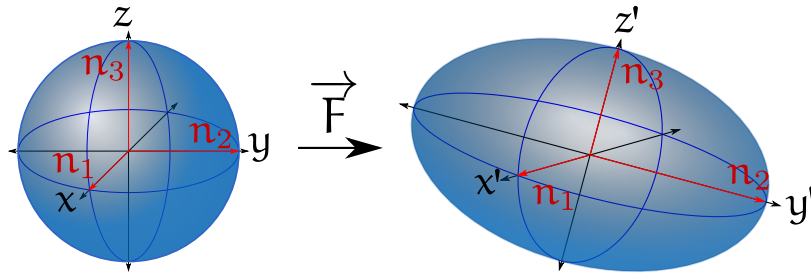


Figura 3-2: Elipsoide de Fresnel para un medio isotrópico antes y después de ser sometido a una carga \vec{F} .

pondientes ecuaciones para la elipsoide de birrefringencia de Fresnel y la elipsoide de estrés de Cauchy de la siguiente forma [1, 8]:

$$\frac{x^2}{n_1^2} + \frac{y^2}{n_2^2} + \frac{z^2}{n_3^2} = 1. \quad (3.2)$$

La Eq. 3.2 Corresponde a la elipsoide de Fresnel, donde n_1 , n_2 y n_3 son los índices de refracción principales a lo largo de los ejes x , y , z , respectivamente. Para la elipsoide de estrés de Cauchy se tiene [1, 6, 9]:

$$\sigma_1 x^2 + \sigma_2 y^2 + \sigma_3 z^2 = 1, \quad (3.3)$$

donde σ_1 , σ_2 y σ_3 son los esfuerzos principales a lo largo de los ejes x , y , z , respectivamente.

Si ambas elipses son coaxiales para el caso de una deformación elástica, los planos de sus secciones circulares deben ser paralelos. Estos planos coinciden con la intersección de cada elipsoide por medio de una esfera concéntrica, de manera que es posible reescribir las Eq. 3.2 y Eq. 3.3 de la siguiente forma,

$$\frac{x^2}{n_1^2} + \frac{y^2}{n_2^2} + \frac{z^2}{n_3^2} = A(x^2 + y^2 + z^2), \quad (3.4)$$

para la elipsoide de Fresnel. Y de la forma,

$$\sigma_1 x^2 + \sigma_2 y^2 + \sigma_3 z^2 = B(x^2 + y^2 + z^2), \quad (3.5)$$

para la elipsoide de estrés de Cauchy.

Si se multiplica el lado izquierdo de la igualdad en la Eq. 3.5 y el lado derecho de la Eq. 3.4 por una constante D , se encuentra una semejanza entre los términos de las ecuaciones resultantes,

$$\left(\frac{1}{n_1^2} - AD\right)x^2 + \left(\frac{1}{n_2^2} - AD\right)y^2 + \left(\frac{1}{n_3^2} - AD\right)z^2 = 0, \quad (3.6)$$

$$(D\sigma_1 - B)x^2 + (D\sigma_2 - B)y^2 + (D\sigma_3 - B)z^2 = 0. \quad (3.7)$$

Haciendo una relación de correspondencia entre la Eq. 3.6 y Eq. 3.7 se obtiene,

$$\frac{1}{n_1^2} = D\sigma_1 + C, \quad \frac{1}{n_2^2} = D\sigma_2 + C, \quad \frac{1}{n_3^2} = D\sigma_3 + C, \quad (3.8)$$

siendo $C = AD - B$. Estas expresiones se describen de manera simplificada como:

$$\frac{1}{n_s^2} = D\sigma_s + C,$$

donde $s = 1, 2, 3$. Expresando la constante C en la forma [1],

$$C = \frac{1}{n^2} + C'_2(\sigma_p + \sigma_q + \sigma_r), \quad (3.9)$$

donde n es el índice de refracción del material sin esfuerzos, C'_2 es un valor constante y $\sigma_p, \sigma_q, \sigma_r$ son tres esfuerzos mutuamente perpendiculares entre si. Al reemplazar la Eq. 3.9 en la Eq. 3.1.2 se obtiene:

$$\begin{aligned} \frac{1}{n_1^2} &= \frac{1}{n^2} + C'_1\sigma_1 + C'_2(\sigma_2 + \sigma_3), \\ \frac{1}{n_2^2} &= \frac{1}{n^2} + C'_1\sigma_2 + C'_2(\sigma_1 + \sigma_3), \\ \frac{1}{n_3^2} &= \frac{1}{n^2} + C'_1\sigma_3 + C'_2(\sigma_1 + \sigma_2), \end{aligned} \quad (3.10)$$

siendo $C'_1 = C'_2 + D$. La Eq. 3.10 puede ser reescrita de la forma,

$$\begin{aligned}
\mathbf{n} - \mathbf{n}_1 &= \frac{\mathbf{n}^2 \mathbf{n}_1^2}{\mathbf{n} + \mathbf{n}_1} [C'_1 \sigma_1 + C'_2 (\sigma_2 + \sigma_3)], \\
\mathbf{n} - \mathbf{n}_2 &= \frac{\mathbf{n}^2 \mathbf{n}_2^2}{\mathbf{n} + \mathbf{n}_2} [C'_1 \sigma_2 + C'_2 (\sigma_1 + \sigma_3)], \\
\mathbf{n} - \mathbf{n}_3 &= \frac{\mathbf{n}^2 \mathbf{n}_3^2}{\mathbf{n} + \mathbf{n}_3} [C'_1 \sigma_3 + C'_2 (\sigma_1 + \sigma_2)].
\end{aligned} \tag{3.11}$$

Para el caso de la birrefringencia por esfuerzo, los cambios en el índice de refracción del material son del orden de 10^{-6} . Debido a esto, la diferencia $(\mathbf{n} - \mathbf{n}_s)$ es pequeña en comparación a \mathbf{n} o \mathbf{n}_s , y es posible aplicar la siguiente aproximación:

$$\frac{\mathbf{n}^2 \mathbf{n}_s^2}{\mathbf{n} + \mathbf{n}_s} \simeq \frac{\mathbf{n}^3}{2}.$$

Ahora, haciendo las siguientes consideraciones,

$$C_1 = -\frac{\mathbf{n}^3}{2} C'_1, \quad C_2 = -\frac{\mathbf{n}^3}{2} C'_2, \tag{3.12}$$

y reemplazando las expresiones de la Eq. 3.12 en Eq. 3.11 se tiene que,

$$\begin{aligned}
\mathbf{n}_1 - \mathbf{n} &= C_1 \sigma_1 + C_2 (\sigma_2 + \sigma_3), \\
\mathbf{n}_2 - \mathbf{n} &= C_1 \sigma_2 + C_2 (\sigma_1 + \sigma_3), \\
\mathbf{n}_3 - \mathbf{n} &= C_1 \sigma_3 + C_2 (\sigma_1 + \sigma_2).
\end{aligned} \tag{3.13}$$

La Eq. 3.13 se denomina ley de estrés óptico (conocida en inglés como *Stress-Optic Law*), esta predice el cambio en los índices de refracción del material en función de los esfuerzos principales en el sistema.

Las constantes C_1 y C_2 se conocen como coeficientes de estrés óptico, y están asociadas a las propiedades elasto-ópticas, al igual que a los coeficientes piezo-ópticos del material [8]. Cualquier cálculo fotoelástico requiere de los coeficientes de estrés óptico, que son característicos de cada material y pueden ser encontrados en la literatura [7]. Para el cálculo de los coeficientes de estrés óptico, se hace uso de un polarímetro en donde se aplica una carga conocida a un material, para generar birrefringencia por

esfuerzo y a partir de los cambios en la polarización calcular C_1 y C_2 [1, 7, 8, 10].

3.1.3. Cálculo de la matriz de Jones mediante el modelo de fotoelasticidad

Debido a que el modelo de la fotoelasticidad se limita al análisis de elementos únicamente de retardo, los efectos de dicroísmo y despolarización no son tomados dentro de consideración, y tanto el cálculo el Jones como el de Mueller son aplicables. Dada la simplicidad que representa trabajar con una matriz de 2×2 elementos, además de ser la más utilizada en este tipo de aplicaciones, se usa la notación de Jones [7]. En la Eq. 2.33 del capítulo anterior, se presenta la expresión de un retardador rotado en la notación de Jones, que depende únicamente del valor de desfase de las componentes y de la orientación de estos con respecto a un marco de referencia, generalmente dado por el eje x o eje horizontal del sistema.

$$J(\delta, \theta) = \begin{bmatrix} \cos\frac{\delta}{2} + i\text{sen}\frac{\delta}{2}\cos 2\theta & i\text{sen}\frac{\delta}{2}\text{sen} 2\theta \\ i\text{sen}\frac{\delta}{2}\text{sen} 2\theta & \cos\frac{\delta}{2} - i\text{sen}\frac{\delta}{2}\cos 2\theta \end{bmatrix}.$$

A continuación, se describe cómo son calculados los parámetros θ y δ para cada elemento.

Cálculo del ángulo de rotación

El ángulo de rotación indica la orientación de los índices de refracción del material con respecto al sistema de referencia utilizado al modelar. Dado que los elementos evaluados con birrefringencia por esfuerzo generalmente presentan deformación elástica, se puede afirmar que las direcciones principales del tensor de esfuerzos para los elementos del modelo, coinciden con la orientación del índice de refracción del material [7]. Puesto que en los elementos ópticos el diámetro suele ser considerablemente mayor que el espesor, cuando se modelan esfuerzos a tracción y compresión, uno de los esfuerzos principales suele coincidir con la dirección del eje óptico del modelo [11]. Para esto se requiere que en el diseño, uno de los ejes del sistema de referencia coincida

con el eje óptico de la pieza a modelar. Luego, las direcciones principales pueden ser calculadas mediante dos métodos: el primero es tomar los cosenos directores calculados durante la diagonalización del tensor de esfuerzos, la rotación del esfuerzo con respecto al sistema de referencia, corresponde al coseno inverso del coseno director en dirección al eje que se desee tomar como referencia, normalmente el x . El segundo método requiere que uno de los esfuerzos principales coincida con el eje óptico del diseño, de esta manera se puede calcular la rotación de los esfuerzos principales a partir de las ecuaciones del círculo de Mohr, de esta forma el ángulo de rotación θ viene dado por [6]:

$$\theta = \frac{1}{2} \tan^{-1} \frac{2\sigma_{xy}}{\sigma_{xx} - \sigma_{yy}}.$$

Al evaluar un elemento polarimétrico es importante tomar dentro de consideración que sus propiedades varían dependiendo del ángulo de incidencia de la iluminación. Esto es debido a que en función de la dirección de incidencia del haz, los índices de refracción que éste percibe del medio pueden cambiar. Tomemos como ejemplo una lámina de retardo de $\lambda/4$, si el haz incide normalmente sobre la superficie plana del retardador, los índices de refracción serán aquellos que generarán un desfase de $\pi/2$ como lo indica el fabricante. Sin embargo, si el haz incide en un ángulo diferente sobre dicha superficie, el valor de los índices de refracción será su proyección sobre el plano normal a la dirección de incidencia del haz. Por lo anterior, se suele buscar que la luz incida perpendicularmente sobre polarizadores y retardadores, sin embargo, esto no es posible en muchos casos. Afortunadamente, siempre que el ángulo de incidencia no sea muy pronunciado (mayor a 10°) el efecto sobre la polarización que se da por el ángulo de incidencia de la luz es ínfimo e incluso despreciable en la mayoría de los casos [11].

Desfase entre componentes

La presencia de diferentes índices de refracción en el medio causa que el camino óptico recorrido por cada una de las componentes ortogonales del campo eléctrico sea

diferente. La diferencia de camino recorrido por ambas componentes se conoce como desfase, y aunque este puede ser de varias longitudes de onda, debido a la periodicidad espacial de las ondas electromagnéticas se le suele acotar en los intervalos $[0, 2\pi]$ o $[0, \lambda]$. La diferencia de camino óptico experimentada por cada componente a causa del cambio en el índice de refracción del medio puede calcularse como:

$$\delta_1 = \frac{2\pi\Delta n_1 L}{\lambda}, \quad \delta_2 = \frac{2\pi\Delta n_2 L}{\lambda},$$

los desfases δ_1 y δ_2 dependen del cambio en los índices de refracción $\Delta n_1 = n_1 - n$ y $\Delta n_2 = n_2 - n$ definidos en la Eq. 3.13 y de la distancia L recorrida por la luz dentro del elemento. El término $2\pi/\lambda$ se utiliza para determinar cuanto fue el desfase en radianes para una longitud de onda específica. Si la luz incide perpendicularmente sobre el elemento, la distancia L recorrida por la luz corresponde al espesor del elemento, en caso contrario se debe utilizar trazado de rayos para determinar el camino de la luz. El parámetro $\delta = \delta_2 - \delta_1$ bajo la notación utilizada.

3.2. Sistema experimental

Para poder obtener un conjunto de medidas experimentales que pudieran ser fácilmente modelables, se propone el siguiente experimento. Una ventana óptica cuadrada de 50,8mm de ancho y 2,5mm de espesor se ubica en un sistema de carga, que permite inducir tanto cargas enteramente mecánicas, como cargas térmicas que generen esfuerzos por deformación termo-elástica. El sistema de carga que se presenta en la Fig. 3-3, consta de un soporte en el que se ubica la ventana óptica y en uno de los cantos de ésta se encuentra un tornillo micrométrico (NEWPORT SM-13), con una resolución de $\pm 1\mu\text{m}$. El tornillo se utiliza para introducir una pequeña deformación puntual en la ventana, y el desplazamiento de este es utilizado como entrada en la simulación. Para inducir cargas térmicas se utiliza una resistencia de alta potencia de 10 Ω y 10W con una corriente de 1 A. La temperatura de la resistencia se controla mediante un sistema en lazo cerrado, utilizando un controlador PID (CONCH P10) que permite regular la temperatura en una región de interés con una estabilidad de

$\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ alrededor de una hora. Condiciones aceptables para el experimento, considerando trabajos previos en los que se ha demostrado que pequeños cambios del orden de 1°C no genera efectos representativos [12].

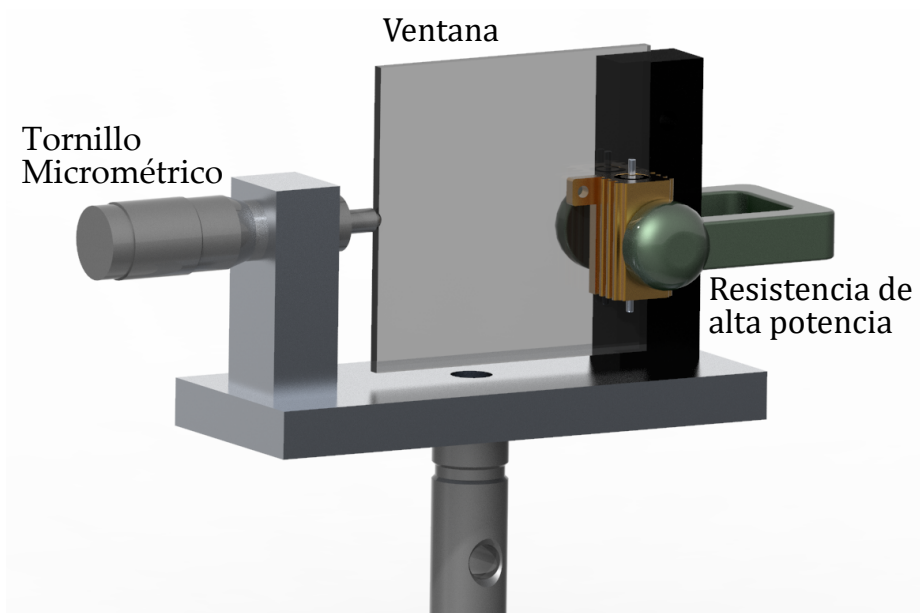


Figura 3-3: Montaje diseñado para generar cargas termo-mecánicas en una ventana óptica cuadrada.

A partir de la configuración típica de un polarímetro a transmisión, se diseñó un sistema para la medición de propiedades polarimétricas en muestras sometidas a cargas controladas. En la Fig. 3-4 se presenta el esquema del sistema óptico implementado; conformado por los siguientes componentes con su respectiva descripción. Se utiliza una fuente led incoherente (THORLABS MCWHLP1) la cual se filtra mediante el uso de un filtro interferencial en $532\text{nm} \pm 0,6\text{nm}$ (THORLABS FL532-3). Un sistema de lentes es utilizado para controlar el camino de la luz hasta la muestra, además de generar regiones en las que sea posible ubicar los componentes del PSG. Las lentes utilizadas son: una de 50 mm de focal y diámetro de 1" (L1. Edmund Optics 32-478) ubicada justo después del filtro interferencial que se utiliza para colectar la mayor cantidad posible de luz de la fuente, una segunda de 75 mm y diámetro de 2" (L2. THORLABS LA1145) que evita que la luz diverja demasiado antes de alcanzar la ventana, y una tercera de 75 mm y diámetro de 1" (L3. Edmund Optics

32-627) que asegura un campo de iluminación sobre la muestra a analizar. En el sistema de iluminación conformado por las lentes descritas se sitúa un par de sistemas de rotación en los que se ubican un polarizador y un retardador de $\lambda/4$ (PSG), que se colocan de manera tal que corten la menor cantidad de luz en el sistema. Luego del segundo rotador se ubica el sistema de carga con la ventana a analizar. Finalmente, se utiliza un sistema de lentes para generar un imagen de la ventana, éste sistema está conformado por una lente de 300mm de focal y diámetro de 3" (L4. Edmund Optics 45-417) que hace converger la luz, y en conjunto con objetivo de cámara (Computar 39084) permite hacer una imagen desmagnificada en un detector CCD (ImagingSource DMK42BU445). El PSA se ubica justo antes del objetivo de cámara, nuevamente buscando que este no corte el camino de la luz.

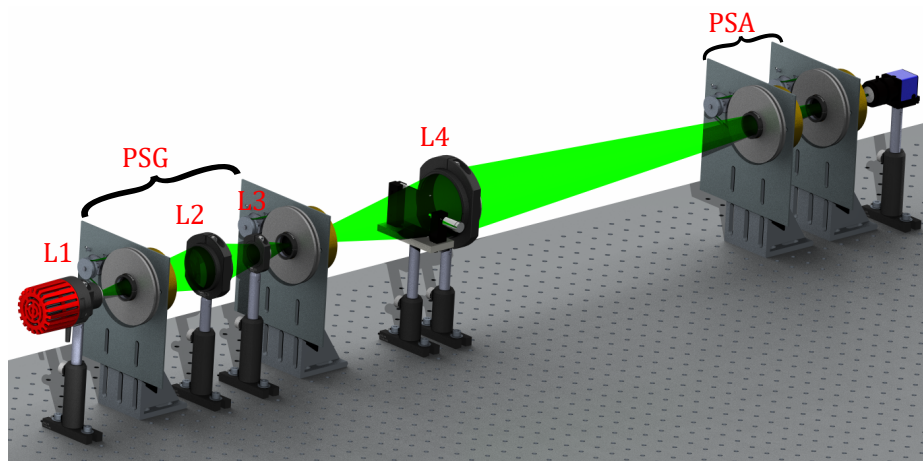


Figura 3-4: Esquema del polarímetro utilizado para la realización de medidas de birrefringencia por esfuerzo.

La Fig. 3-5(a) es un ejemplo del tipo de imágenes obtenidas cuando se ilumina con polarización horizontal y se analiza el mismo estado. En la Fig. 3-5(b) se presenta la imagen obtenida mediante el sistema para una ventana de silicio fundido (*Fused Silica* (FS)), sobre la cual se genera una carga puntual, al introducir un desplazamiento de $100\mu\text{m}$ con el tornillo micrométrico y observar la ventana entre polarizadores cruzados. Es decir, el objeto es iluminado con polarización horizontal y analizado para polarización vertical. Puesto que el PSG y PSA están en estados ortogonales la intensidad medida por el detector debería tender a cero, sin embargo, debido a la

birrefringencia por esfuerzo del material se puede observar dos lóbulos brillantes en la zona de carga, indicando que hubo cambios en la polarización de la luz y esta no se encuentra polarizada horizontalmente.

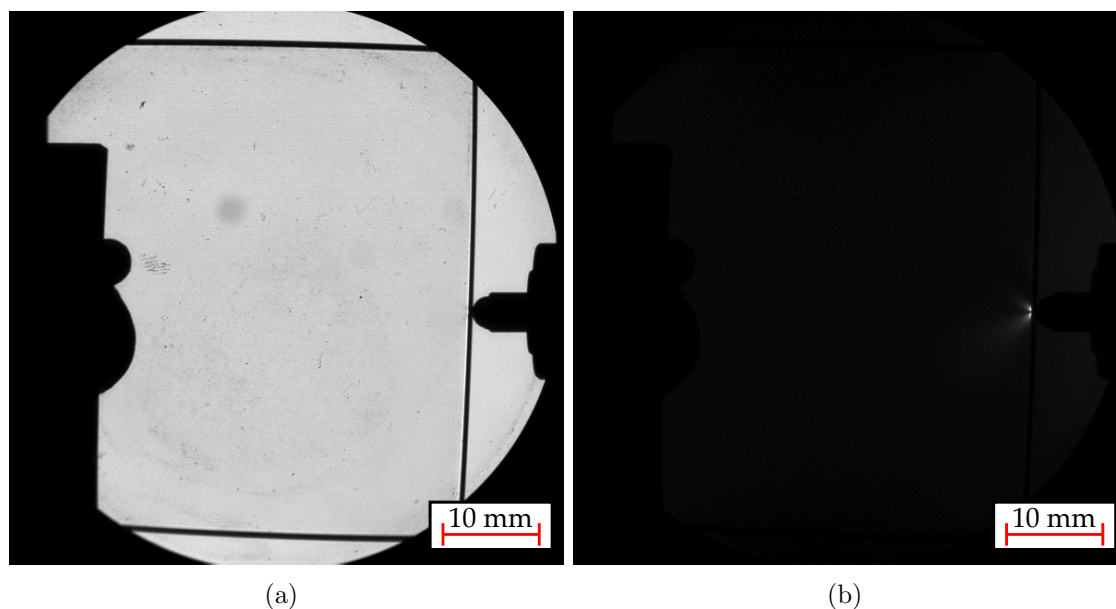


Figura 3-5: Imágenes obtenidas al iluminar la ventana óptica con polarización horizontal y analizar polarización horizontal (a) y vertical (b).

3.3. Simulación

El procedimiento para simular los efectos de una carga externa en un elemento óptico requiere de básicamente dos etapas. Primero, un modelo de elementos finitos se utiliza para determinar los esfuerzos internos en el material debidos a las cargas aplicadas. *Mechanical ANSYS Parametric Design Language* (APDL) de ANSYS se usa para modelar y resolver el sistema experimental, obteniendo así, la distribución de esfuerzos y deformaciones. Segundo, utilizando las leyes de la fotoelasticidad, ya presentadas en este capítulo se determina los cambios en el índice de refracción del material, y utilizando los modelos de birrefringencia por esfuerzo de Doyle et al. [7] se pueden calcular el error del frente de onda y los cambios en la polarización de la luz.

3.3.1. Cálculo de esfuerzos y deformaciones

ANSYS es un software basado en el método de elementos finitos (*Finite Element Method*. FEM), el cual permite resolver problemas físicos para una amplia variedad de problemas. ANSYS consta de tres etapas para el desarrollo y análisis de un modelo. Primero, requiere definir el tipo de sistema que se desea modelar, ya que cada problema presenta sus propias ecuaciones de equilibrio, en nuestro caso se utilizan los modelos asociados a sistemas estructurales y térmicos. Segundo, se define la geometría del sistema y los materiales que lo componen para finalmente discretizar el modelo. La geometría generalmente se diseña en una interfaz de CAD, se asocia un material a cada componente y luego se procede a seleccionar la discretización que mejor permita muestrear el sistema. Cada uno de las subdivisiones del diseño se conocen como elementos, y es sobre ellas que se calculan las soluciones del sistema. Finalmente, se definen las restricciones del sistema o grados de libertad. Se debe determinar las zonas en las cuales se restringe el desplazamiento del sistema apropiadamente para asegurar la solución del modelo. Posteriormente se definen condiciones de contacto para modelar efectos de fricción o transferencia de calor y se imponen las cargas que actúan sobre el sistema. Una vez cumplidas estas tres etapas, se puede dar solución al problema.

Se desea modelar una ventana óptica y los efectos que el sistema de carga desarrollado tienen sobre ella, para ello se programó un *script* en APDL donde se pueden definir los materiales a utilizar en caso de que se usen diferentes tipos de ventanas, además de permitir modificar la magnitud de las cargas mecánicas y térmicas. Por simplicidad un único código fue desarrollado, en este se utiliza un modelo acoplado para resolver problemas por deformación termo-mecánica. Primero se propone un sistema térmico y se soluciona, las deformaciones térmicas obtenidas son utilizadas como entradas para un modelo estructural, el cual se resuelve para obtener la distribución de esfuerzos final. En caso de que se desee evaluar cargas enteramente mecánicas, la temperatura de la resistencia o fuente térmica, debe coincidir con la temperatura ambiente del modelo.

La geometría utilizada y su respectivo mallado se presenta en la Fig. 3-6. En esta se busca utilizar la menor cantidad de componentes para simplificar el modelo, además de permitir utilizar más nodos para muestrear la ventana, ya que el número de nodos que se pueden utilizar en el sistema está limitado por el software. En el diseño se pueden observar cuatro piezas, la ventana óptica, la montura de de la ventana, la cabeza del tornillo micrométrico y la resistencia de alta potencia utilizada como fuente de calor. Entre todas las piezas se definen condiciones de contacto, estas son de transferencia de calor y fricción.

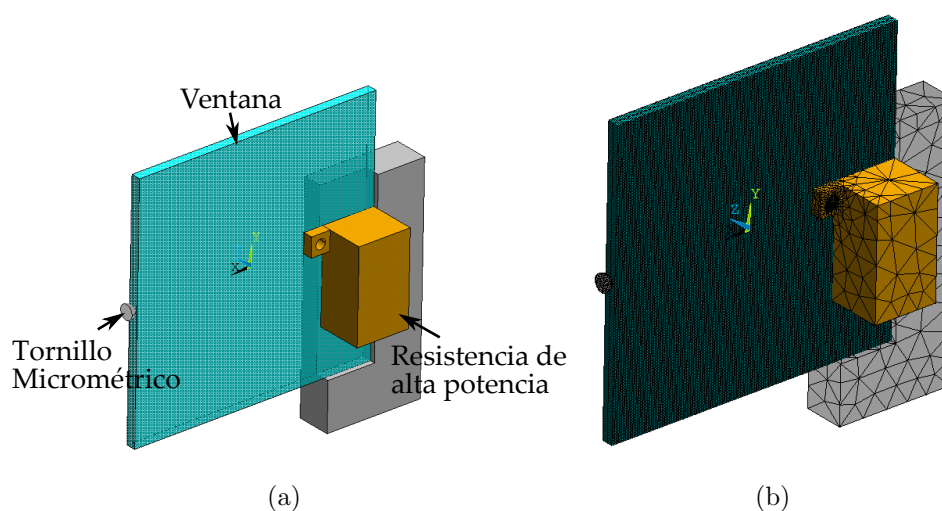


Figura 3-6: Geometría del sistema de carga de la ventana óptica utilizado para la solución a través de FEM. (a) Geometría utilizada para modelo FEM, (b) Mallado utilizado.

Las restricciones y cargas del sistema se presentan en la Fig. 3-7. La montura de la ventana se restringe en su base, dando estabilidad estructural al sistema, además la resistencia que funciona como fuente de calor se ha utilizado para sujetar la ventana y restringir su desplazamiento de z . Estas restricciones se representan como triángulos azules en la Fig. 3-7(b). Para efectos térmicos, una capa de temperatura por convección se ha aplicado al modelo. Esta capa es de aire y se toma una temperatura ambiente de 20°C . Sobre la sección transversal de la semiesfera que representa el efecto del tornillo micrométrico se impone un desplazamiento correspondiente al que se realiza experimentalmente. El volumen de la resistencia se coloca a la temperatura in-

dicada por el PID en la medida. Las condiciones de contacto por fricción impiden que la ventana se deslice, mientras que las condiciones de transferencia de calor permiten obtener los gradientes de temperatura por conducción.

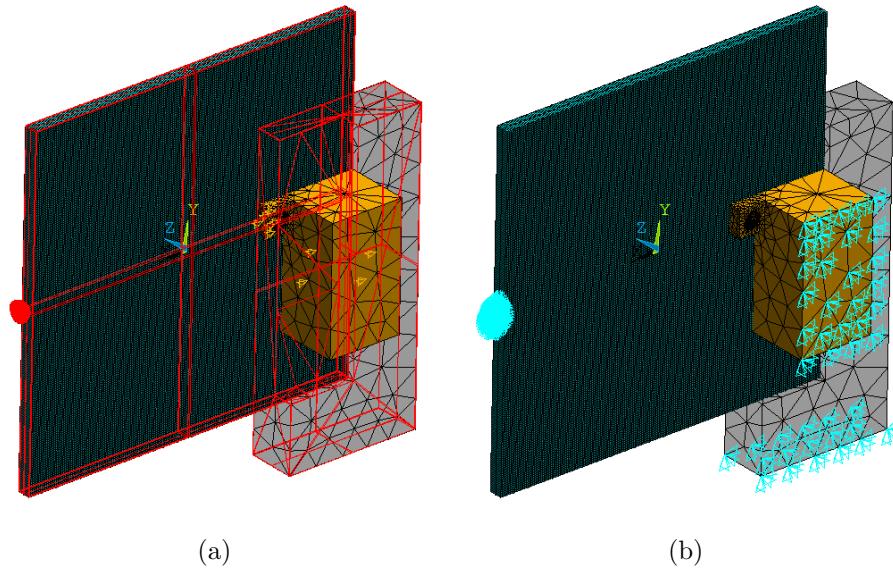


Figura 3-7: Grados de libertad y cargas para la simulación de la ventana óptica. (a) Térmicas y (b) restricciones de desplazamiento.

La Fig. 3-8 es la solución al modelo térmico para una temperatura de 140°C en la resistencia utilizada como fuente de calor. La ventana presenta un gradiente de temperatura con una magnitud máxima en la región de contacto con la resistencia, y permite calcular la expansión térmica del material, que está restringida por la estructura sobre la que se encuentra la ventana y genera esfuerzos sobre la misma.

La Fig. 3-9(a) es la solución al modelo mecánico utilizando la expansión térmica del material como entrada, además de un desplazamiento de $150\mu\text{m}$ en el tornillo micrométrico. La Fig. 3-9(b) corresponde a los esfuerzos de Von Mises del elemento, y permiten determinar si la ventana sufrirá una falla mecánica debido a las cargas a las que se encuentra sometida. Los vidrios ópticos suelen comportarse como un metal dúctil en su región elástica, con la diferencia de que una vez pasan el límite elástico, su región plástica es sumamente estrecha, de manera que para el caso de un vidrio, su esfuerzo límite puede ser considerado como su esfuerzo de ruptura [13]. Los vidrios ópticos suelen presentar un límite de esfuerzo aparente entre 30MPa y

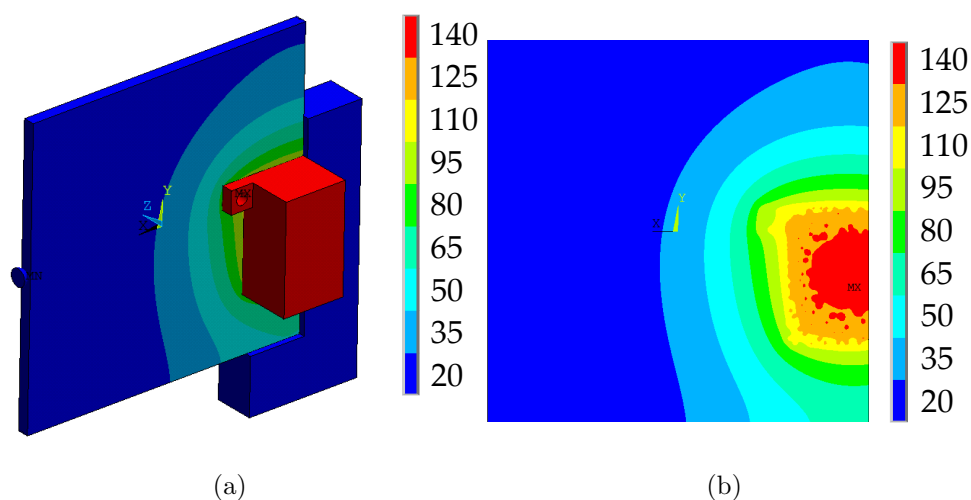


Figura 3-8: Gradiente de temperatura para el modelo (a) y la ventana (b). La escala de colores está en $^{\circ}\text{C}$., obtenidos mediante la solución para sistemas térmicos.

175MPa, específicamente para el caso de un BK7 como el que se ha utilizado en la simulación es de 63,5MPa, dato tomado de [14]. Ya que el máximo esfuerzo de Von Mises presente en la ventana es inferior a su límite de esfuerzo aparente se puede afirmar que la ventana no se fracturará. Otro criterio de falla, utilizado en materiales frágiles como el vidrio, es la tresca o esfuerzo máximo al cortante [13], no obstante, a través del estudio en la literatura no se encontró su valor específico para el vidrio BK7. El esfuerzo al cortante máximo del vidrio suele estar cerca de los 70MPa, y utilizando conversiones basadas en la teoría de la superficie de fluencia se encontró que la tresca máxima sobre la ventana es de aproximadamente 2MPa [13]. Bajo el criterio de esfuerzo máximo al cortante, también se llegó a la conclusión de que la ventana no se fracturaría bajo las cargas aplicadas.

3.3.2. Procesamiento en matlab

Una vez calculado el tensor de esfuerzos para cada elemento representado en los nodos del modelo, se exportan los datos a Matlab para poder determinar la matriz de Jones en cada elemento discretizado. Primero se diagonaliza el tensor de esfuerzos, para obtener los esfuerzos y direcciones principales del modelo. Matlab puede realizar este cálculo rápidamente como un problema de autovalores y autovectores.

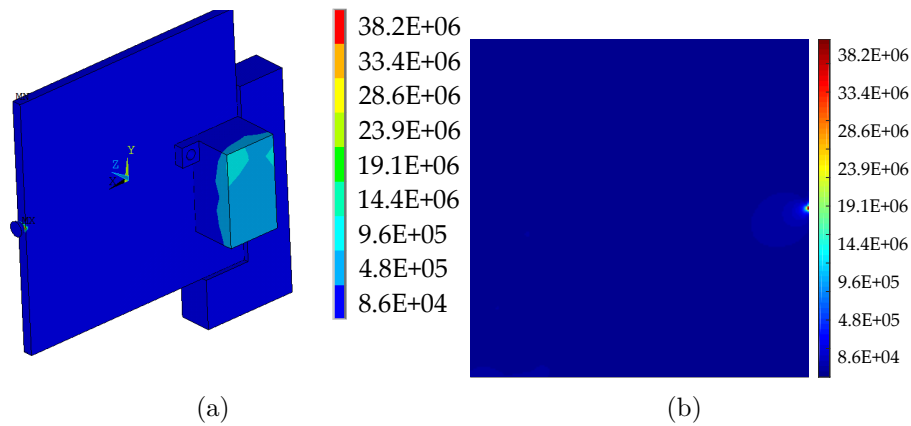


Figura 3-9: Esfuerzos de Von Mises obtenidos mediante la solución de un sistema estructural para el modelo (a) y la ventana (b). Los esfuerzos están en Pa.

Luego, se determina cuales son los esfuerzos principales a utilizar para el cálculo de la birrefringencia, ya que la mayoría de los software entregan los autovalores en forma descendente, por lo que no es posible discernir que esfuerzos principales se encuentran sobre el plano normal al eje óptico del elemento. Se realiza el producto punto entre cada coseno director y un vector unitario en la dirección del eje óptico, el producto más cercano a uno corresponde a la componente orientada en la dirección de incidencia de la luz, las componentes restantes son utilizadas como σ_1 y σ_2 para los cálculos de birrefringencia. Si el ángulo que forma el coseno director de σ_3 con respecto al eje óptico es menor a 5° se calcula θ a partir de los cosenos directores de σ_1 y σ_2 con respecto a x , en caso de que haya una diferencia mayor a 5° se rota el sistema coordenado y se proyectan los esfuerzos principales para que la dirección de σ_3 coincida con el eje óptico y se calcula θ a partir de identidades trigonométricas. Utilizando los esfuerzos principales se calcula los cambios en el índice de refracción a partir de la Eq. 3.13.

Cuando un fabricante reporta las propiedades polarimétricas de un elemento lo suele hacer para un haz con incidencia normal, no obstante, en algunas aplicaciones la luz incide en diferentes ángulos, lo cual causa que el camino óptico de la luz a través del medio cambie, al igual que los índices de refracción que percibe. Se utiliza un trazador de rayos sin aproximación paraxial para calcular la distancia que recorre la luz entre superficies. En la Fig. 3-10 se presenta un esquema del trazado de rayos utilizado, cada

rayo proveniente de una fuente puntual incide sobre una primera superficie del modelo, a continuación se calcula los índices de refracción y birrefringencia para ese punto. Dado que los nodos se encuentran sobre la superficie y no representan directamente un diferencial de volumen, se toman el índice de refracción y birrefringencia promedio de cada elemento a partir de los nodos de lo componen. Con los índices de refracción del medio se calcula el ángulo de refracción de la luz y el camino que este recorre sobre el elemento, para así obtener la matriz de Jones de este primer tramo. El proceso se repite para los diferentes elementos que componen el volumen total. Finalmente, se calcula una única matriz de Jones para cada rayo como el producto de las matrices de cada uno de los elementos que recorrió.

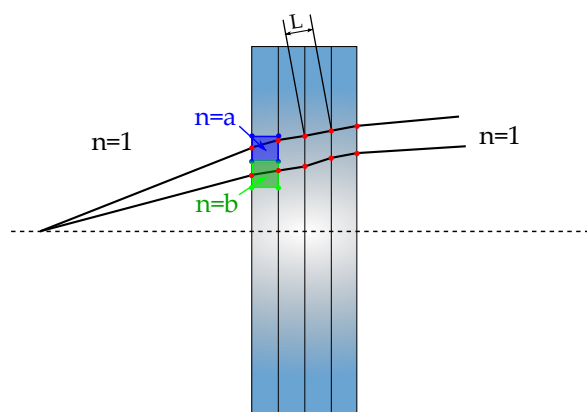


Figura 3-10: Concepto utilizado en la realización del trazado de rayos para el cálculo de camino óptico.

3.4. Resultados y análisis

Dos tipos de análisis fueron realizados, el primero para una carga enteramente mecánica y el segundo con deformación termo-elástica, ambos para dos ventanas ópticas de distintos materiales, FS y BK7. Primero, se evalúan los resultados obtenidos mediante la aplicación de una carga mecánica a temperatura ambiente, ya que son más fáciles de entender y permiten explicar de manera más clara el efecto de la birrefringencia por esfuerzo sobre la luz. En la Fig. 3-11 se presenta las imágenes polarimétricas obtenidas al iluminar una ventana de FS sometida a una carga mecánica

puntual debida a un desplazamiento de $150\mu\text{m}$ en el tornillo micrométrico, la muestra se ilumina con polarización horizontal y se analiza para polarización vertical (Fig. 3-11(a)), circular derecha (Fig. 3-11(b)) y circular izquierda (Fig. 3-11(c)). Mediante estas imágenes es posible afirmar que hay un cambio en la polarización de la luz debido a birrefringencia por esfuerzo, sin embargo, no es posible determinar cuál fue dicho cambio o su magnitud. La Fig. 3-11(a) indica que la polarización de la luz ya no es horizontal en la región brillante, por otro lado la Fig. 3-11(b) y Fig. 3-11(c) muestran dos lóbulos, uno brillante y otro oscuro, permitiendo determinar que la luz no solo dejó de estar polarizada horizontalmente, sino, que tiene polarización levógira o dextrógira. La región brillante al analizar polarización circular derecha significa que la luz en dicho punto tiene polarización dextrógira y la oscura levógira.

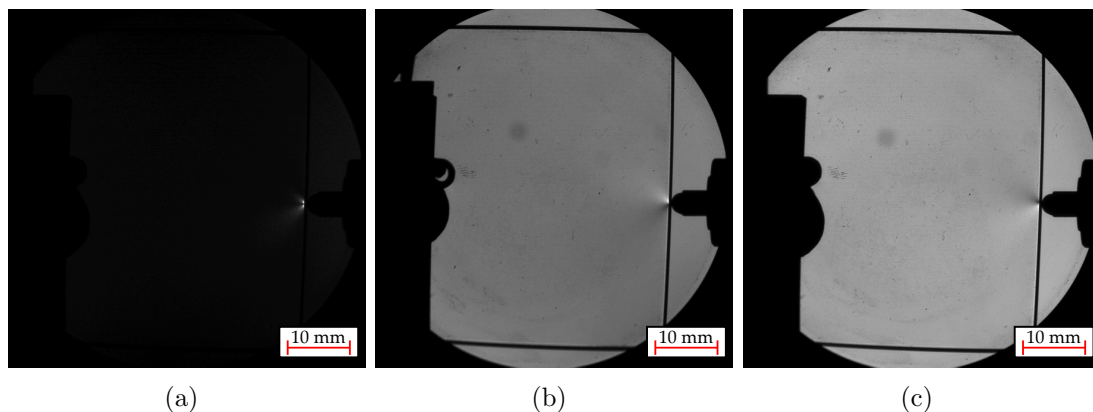


Figura 3-11: Imágenes obtenidas al iluminar la ventana óptica con polarización horizontal y analizar polarización vertical (a), circular derecha (b) y circular izquierda (c).

El mismo análisis se puede realizar para diferentes estados a la entrada y algunos otros en el PSA, no obstante, estas imágenes no permite discernir con precisión cual es el comportamiento del medio o sus propiedades ópticas. Una forma de caracterizar el medio es determinar la matriz de Mueller que lo representa, ya que con esta es posible conocer el estado de polarización de la luz a la salida siempre que se conozca el estado a la entrada. Representar gráficamente la matriz de Mueller de cada pixel de la imagen que conforma la ventana no es posible, en su lugar, se utiliza el desfase δ introducido por el medio y la orientación del elemento con respecto al eje horizontal.

La Fig. 3-12 corresponde a las imágenes de desfase y ángulo de orientación de la matriz para una ventana de BK7 y otra de FS, en ambas con un desplazamiento de $150\mu\text{m}$ en el tornillo micrométrico.

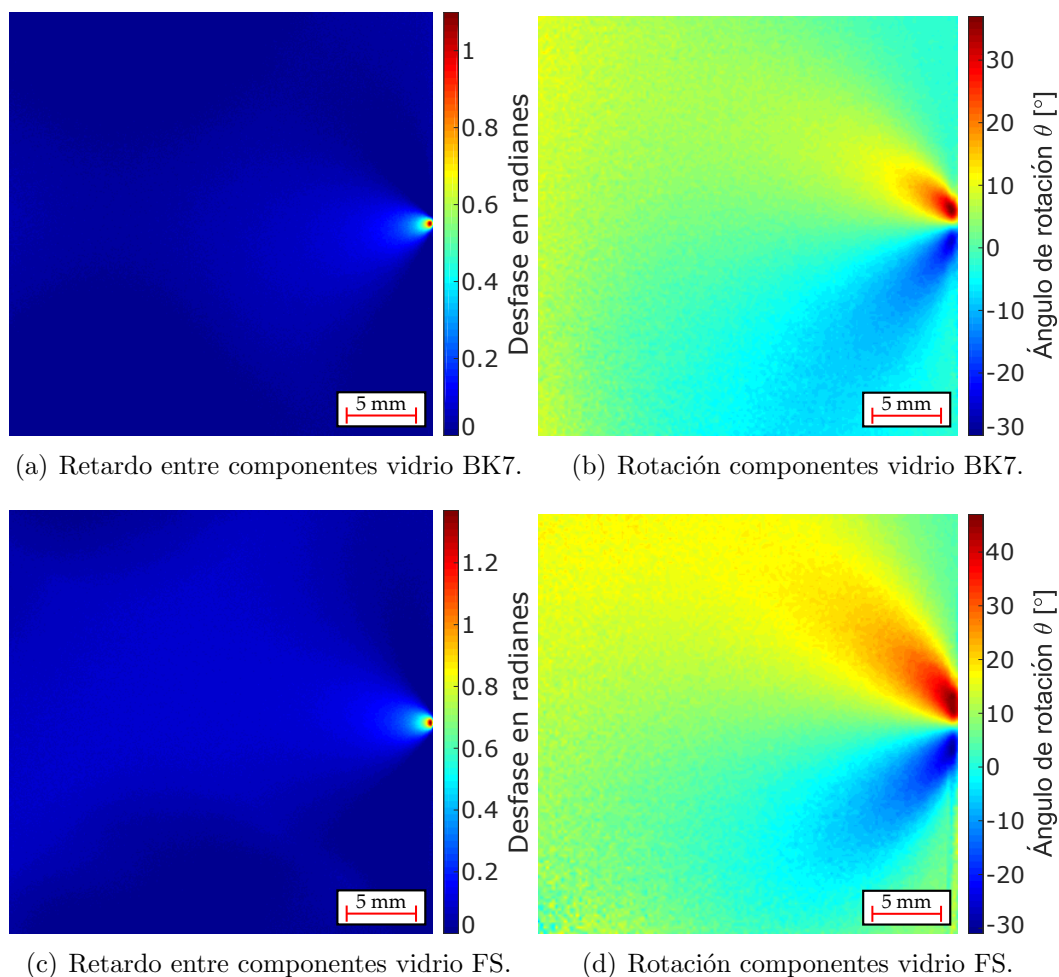


Figura 3-12: Mapas de retardo y rotación para una ventana de vidrio BK7 (a,b) y otra de vidrio FS (c,d). El retardo está en radianes y los ángulos en grados ($^{\circ}$).

Al observar los mapas de ambos vidrios se entiende que estos son similares, indicando que la respuesta de ambos ante una carga puntual es similar, no obstante, a través de la medición cuantitativa del desfase y rotación de las matrices de Mueller se observa que ante una carga mecánica el vidrio de FS introduce cambios más grandes sobre la polarización de la luz, ya que no solo el desfase que este introduce es mayor, sino su rotación también. Sobre la forma de los mapas, el desfase es mayor en la zona que se introduce la carga puntual, y a medida que nos alejamos de este punto

disminuye rápidamente, esto explica que en las imágenes de la Fig. 3-11 la región en la que se aprecian cambios en la polarización es de aproximadamente 1mm. En las Figs. 3-12(b) y 3-12(b) se observan dos lóbulos, en la región superior es positivo y en la inferior negativo, lo cual explica la dirección de rotación de la polarización. Además, aunque la rotación de las matrices se da en toda la imagen, debido a que el desfase es aproximadamente cero a excepción de la zona donde se aplica la carga mecánica, éstas rotaciones no son apreciables.

Los cambios en las propiedades ópticas del material pueden ser modelados mediante el modelo de fotoelasticidad, permitiendo conocer de antemano como se verá afectada la polarización de la luz al pasar a través del medio. Utilizando los resultados de la simulación en elementos finitos se calcula la matriz de Mueller teórica de la ventana. Nuevamente, se utiliza el desfase y ángulo de rotación para la representación de las matrices. La Fig. 3-13 presenta la simulación para una ventana de BK7, en la que se aprecia que las imágenes son similares al caso experimental, con la particularidad que la simulación es mucho más simétrica y no presenta efectos de ruido. Los resultados de la ventana de FS no se presentan, ya que no aportan ningún resultado adicional, y el resultado obtenido mediante la simulación de la ventana de BK7 es lo suficientemente descriptivo para ejemplificar los resultados obtenidos.

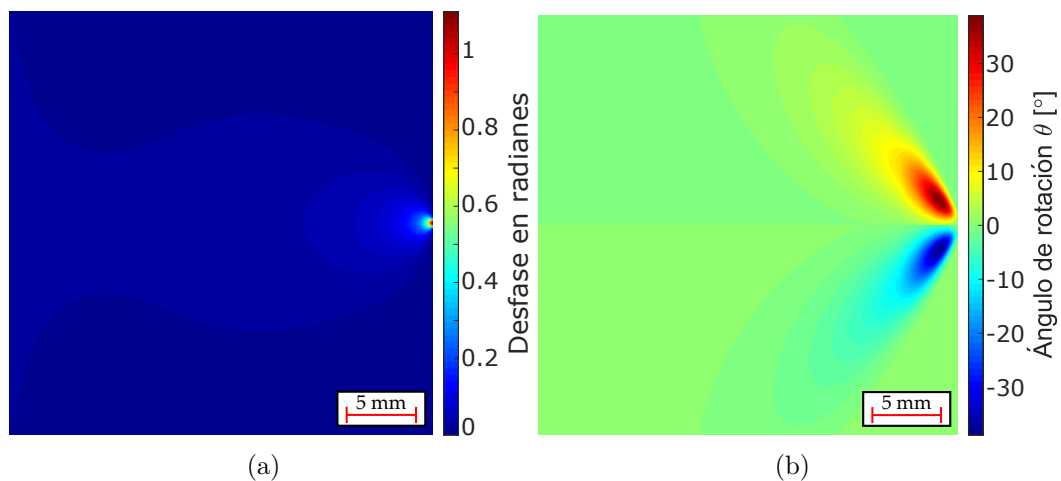


Figura 3-13: Mapas de retardo y rotación para una ventana de vidrio BK7 simulada. El retardo está en radianes y los ángulos en grados ($^{\circ}$).

Dependiendo de la aplicación, la información concerniente a las propiedades ópti-

cas del material puede ser utilizada para medir esfuerzos o hallar planos cristalinicos en minerales [15], no obstante, en algunos casos es suficiente conocer cómo el medio cambia la polarización de la luz. En la Fig. 3-14 se muestran dos mapas de polarización para un conjunto de rayos que inciden con polarización vertical a través del vidrio BK7. En la Fig. 3-14(a) se muestra el área sobre la que se calculará la polarización de la luz luego de pasar a través del elemento. La Fig. 3-14(b) presenta el mapa experimental, mientras que la Fig. 3-14(c) el calculado mediante el modelo de fotoelasticidad. Las elipses en rojo indican polarización dextrógira y en azul levógira. Como se observa hay una correspondencia entre el ángulo al que está rotado la matriz de Mueller y la dirección de rotación de la polarización luego de pasar por el medio. Además, cerca de la región donde se aplica la carga la elipticidad de la polarización se ve afectada en mayor medida. En la imagen experimental se puede observar que el cambio en la polarización no es simétrico a diferencia del caso simulado, esto debido principalmente a que la carga no debe ser totalmente axial en el sistema experimental, mientras que en la simulación si lo es. El error porcentual para los parámetros ϕ y e de las elipses de polarización simuladas con respecto a las experimentales ha sido utilizado como métrica del error. Se calcula el error para cada par de elipses y luego se promedia, los errores obtenidos son de 0,5% para ϕ y 0,7% para e .

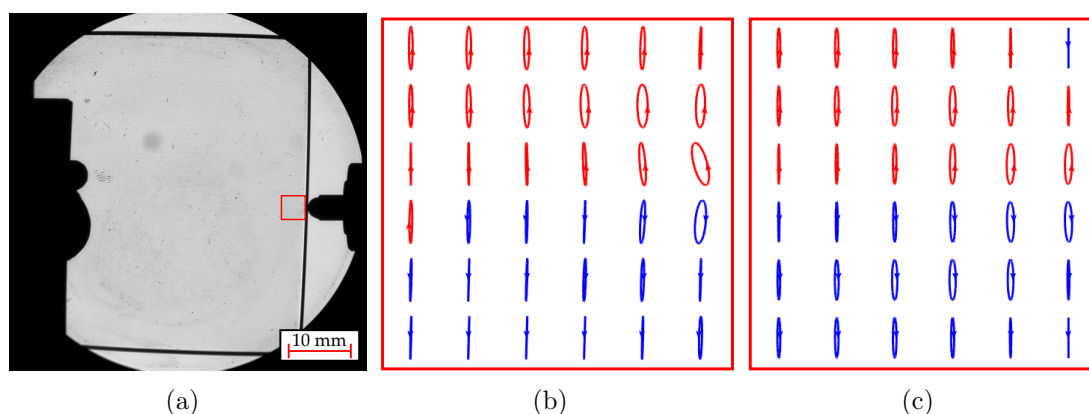
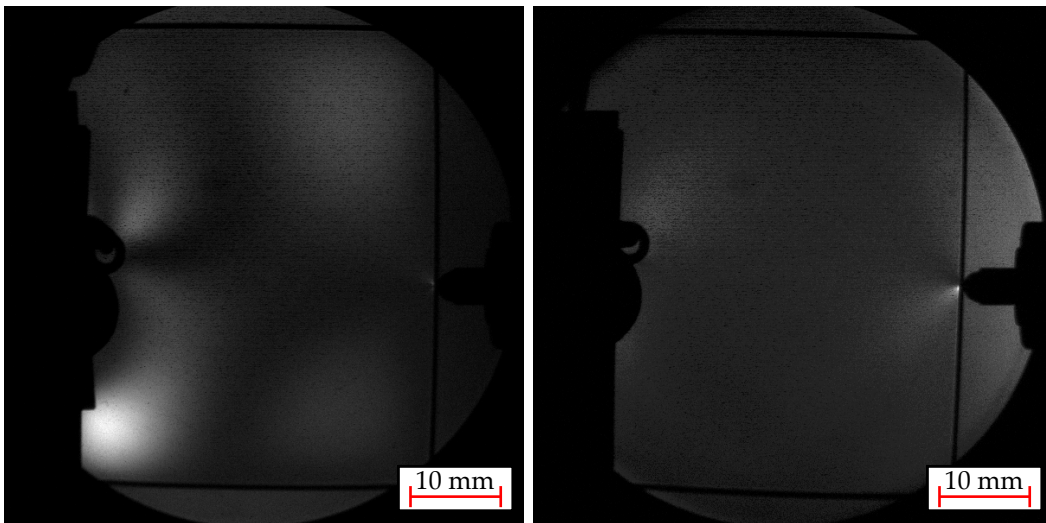


Figura 3-14: Mapas de polarización para una carga mecánica obtenidos experimentalmente (b) y mediante el modelo de foto-elasticidad(c). La Fig. (a) muestra el área que está siendo mapeada.

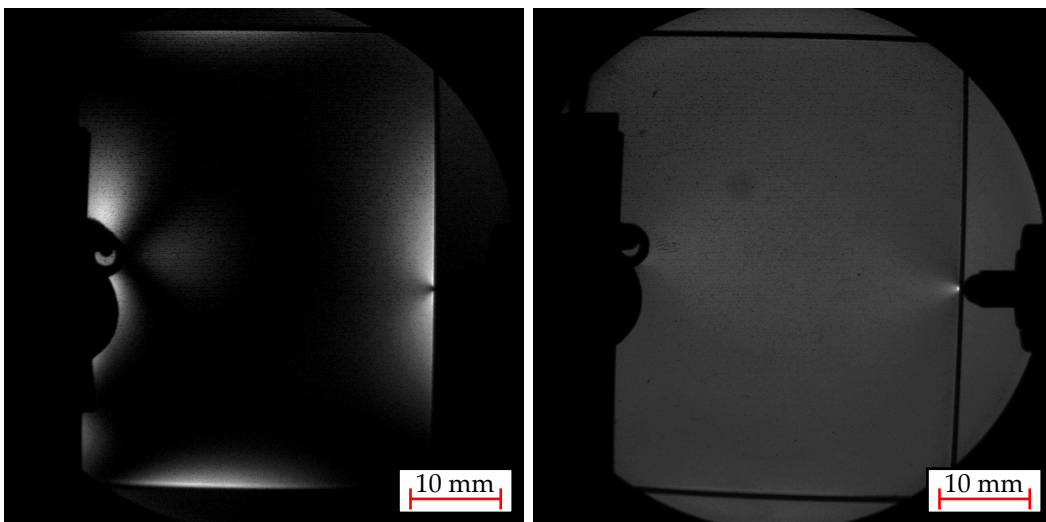
Cuando se aplicó una carga térmica a las ventanas mediante una resistencia de

potencia a una temperatura de 140°C , se obtuvieron las imágenes presentadas en la Fig. 3-15. Es fácilmente apreciable que el vidrio BK7 (ubicado a la izquierda) presenta cambios más evidentes sobre la polarización que el vidrio de FS, esto debido a que el BK7 posee una constante de expansión térmica de $8,3 \times 10^{-6}\text{m/m}^{\circ}\text{C}$, mientras que la del FS es de $4 \times 10^{-6}\text{m/m}^{\circ}\text{C}$. Como la constante de expansión térmica del BK7 es aproximadamente el doble de la del FS, las deformaciones que se dan para el BK7 son mayores que en el FS bajo una misma carga térmica.



(a) Ventana de BK7 con iluminación Horizontal.

(b) Ventana de FS con iluminación Horizontal.

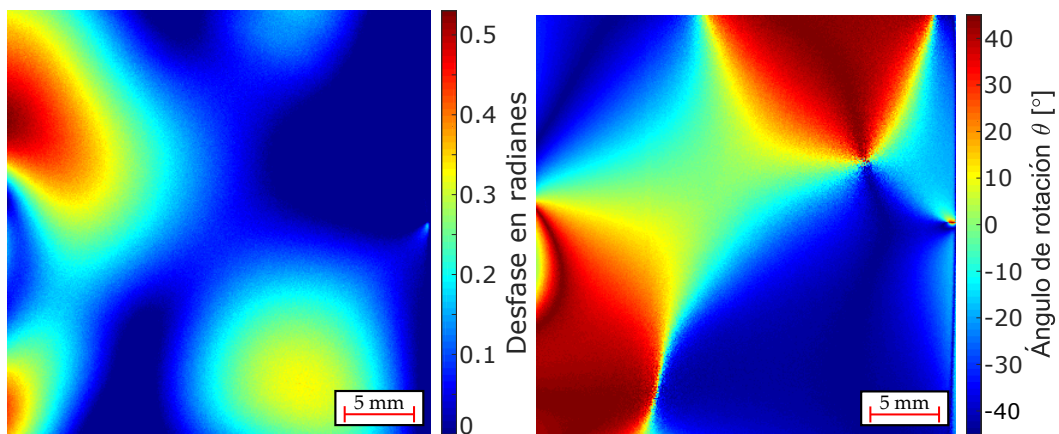


(c) Ventana de BK7 con iluminación a $+45^{\circ}$.

(d) Ventana de FS con iluminación a $+45^{\circ}$.

Figura 3-15: Imágenes obtenidas mediante polarizadores cruzados para dos ventanas, una de BK7 y otra de FS sometidas a deformaciones termo-mecánicas.

Ahora, se calcula las matrices de Mueller para una ventana de BK7 sometida a una temperatura de 140°C y una carga puntual debida a un desplazamiento de $150\mu\text{m}$ en el tornillo micrométrico. En la imagen de desfase (Fig. 3-16(a)) se observa que el efecto de la carga mecánica introducida por el tornillo es pequeño en comparación con la Fig. 3-12(a), en su lugar, un conjunto de zonas dadas por la expansión de la ventana en la estructura mecánica del sistema se presentan. El mapa del ángulo de rotación de la matriz presenta cierta simetría alrededor de un punto en la región superior izquierda de la imagen, nuevamente debido a la estructura mecánica del soporte. Es posible presumir que al realizar una sujeción más uniforme sobre todos los lados de la ventana e imponer una carga más centrada, los cambios en las propiedades del medio serían más simétricos y alrededor del centro de la ventana.

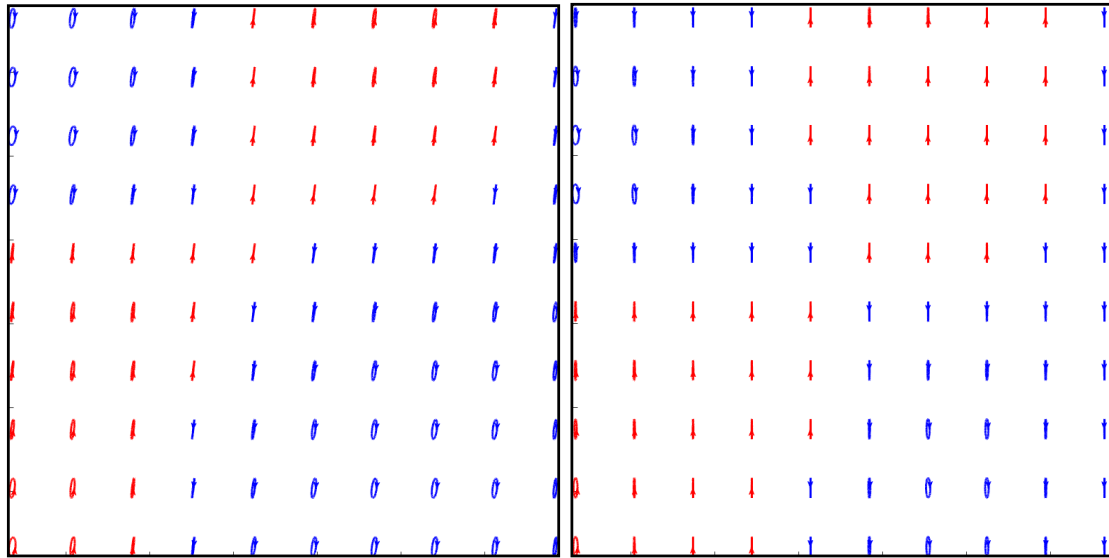


(a) Retardo entre componentes vidrio BK7. (b) Rotación componentes vidrio BK7.

Figura 3-16: Mapas de retardo y rotación para una ventana de vidrio BK7 sometida a deformación termo-elástica. El retardo está en radianes y los ángulos en grados ($^{\circ}$).

Al iluminar la ventana con un haz polarizado linealmente en y se obtiene la Fig. 3-17. La Fig. 3-17(a) presenta el mapa experimental en el que se puede observar que nuevamente dependiendo del signo en el ángulo de rotación de la matriz, cambia el sentido de giro de la polarización, además, en las zonas en las que hay un desfase apreciable, la elipticidad de las elipses es mayor. El caso simulado se presenta en la Fig. 3-17(b), cuyo comportamiento es relativamente similar al experimental, aunque el punto de simetría se encuentra desplazado y los cambios en la elipticidad de la luz son menores. Considerando todos los posibles factores que intervienen en el modelo

térmico (composición de los materiales, flujo de aire, deformación térmica de montura, entre otros), la predicción obtenida es cercana al resultado experimental. El error porcentual entre los parámetros ϕ y e de las elipses simuladas y las experimentales son del 12,1% y 8% respectivamente.



(a) Mapa de polarización experimental.

(b) Mapa de polarización obtenido mediante el modelo de foto-elasticidad.

Figura 3-17: Mapas de polarización para una carga termo-mecánica obtenidos experimentalmente (a) y mediante el modelo de foto-elasticidad(b).

Esta primera evaluación de los métodos polarimétricos ejemplifica su aplicabilidad para el análisis de las propiedades ópticas en medios, lo cual sirve de premisa para su implementación en técnicas de observación en muestras biológicas. En el siguiente capítulo se abordará el desarrollo del microscopio de luz polarizada, tomando en consideración aspectos del funcionamiento en el polarímetro utilizado en este capítulo.

Referencias

- [1] P. S. Theocaris and E. Gdoutos. *Matrix Theory of Photoelasticity*, volume 11 of *Springer Series in Optical Sciences*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1979. [83](#), [84](#), [85](#), [86](#), [87](#), [88](#), [90](#)
- [2] K. Barnham, C. Chambers, N. Hunter, and E. Labrecque. *Science Biographies*. Raintree Perspectives: Science Biographies. Heinemann-Raintree, 2014. [83](#), [84](#)
- [3] A. Lanin and I. Fedik. *Thermal Stress Resistance of Materials*. Springer Berlin Heidelberg, 2008. [84](#)
- [4] A.F. Bower. *Applied Mechanics of Solids*. CRC Press, 2009. [84](#)
- [5] O.C. Zienkiewicz and R.L. Taylor. *The Finite Element Method: Solid mechanics*. Referex collection.Mecánica y materiales. Butterworth-Heinemann, 2000. [85](#)
- [6] P. Howell, G. Kozyreff, and J. Ockendon. *Applied Solid Mechanics*. Cambridge Texts in Applied Mathematics. Cambridge University Press, 2008. [85](#), [87](#), [91](#)
- [7] K. B. Doyle, V. L. Genberg, and G. J. Michels. *Integrated optomechanical analysis*. Number PM223 in SPIE Press. SPIE Press, Bellingham, Washington, USA, second edition edition, 2012. [86](#), [89](#), [90](#), [95](#)
- [8] A. Yariv and P. Yeh. *Optical waves in crystals*. Wiley Series in Pure and Applied Optics. Wiley, 1984. [86](#), [87](#), [89](#), [90](#)
- [9] J. L. Synge. *Principles of Classical Mechanics and Field Theory*. Encyclopedia of Physics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1st. edition, 1960. [87](#)

-
- [10] J. Bombenger, A. Barsella, C. Carré, G. Taupier, K. (Honorat) Dorkenoo, and L. Mager. Stress birefringence patterning in photopolymer induced by structured illumination. *Optical Materials*, **35**(5):923–926, March 2013. 90
- [11] H. Gross, F. Blechinger, and B. Achtner. *Handbook of Optical Systems, Survey of Optical Instruments*. Handbook of Optical Systems. Wiley, 2008. 90, 91
- [12] H. Chen, H. Yang, X. Yu, and Z. Shi. Simulated and experimental study of laser-beam-induced thermal aberrations in precision optical systems. *Applied Optics*, **52**(18):4370, June 2013. 93
- [13] R.A. Serway, J.W. Jewett, and V. Perroomian. *Physics for Scientists and Engineers*. Number v. 2 in Physics for Scientists and Engineers. Brooks/Cole, Cengage Learning, 2014. 98, 99
- [14] Crystran. Optical glass n-bk7 properties. Accessed: 2017-11-01. <https://www.crystran.co.uk/optical-materials/optical-glass-n-bk7-and-others>. 99
- [15] T. Yoshizawa. *Handbook of Optical Metrology: Principles and Applications*. Taylor & Francis Group, United States, 2nd. edition, 2014. 105

Capítulo 4

Diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada

En este capítulo se presenta el diseño e implementación del microscopio de luz polarizada desarrollado en este trabajo. En la primera sección se tratan los tópicos generales de los sistemas de microscopía. Luego se presentan las consideraciones de diseño utilizadas, incluyendo los conceptos necesarios para el diseño de los sistemas de iluminación y el análisis de las propiedades polarimétricas del instrumento. En una tercera sección se expone el diseño realizado mediante OpticStudio, además, de un análisis sobre comportamiento del instrumento diseñado. Después, se describe la implementación realizada y se evaluó el desempeño del microscopio.

4.1. Tópicos generales de los sistemas de microscopía

El microscopio óptico es un sistema formador de imagen que presenta la particularidad de generar grandes magnificaciones con pocas aberraciones. En la actualidad la aplicación de las técnicas de microscopía ha diversificado su campo de acción en diferentes disciplinas, mediante la inclusión de métodos ópticos en los clásicos sistemas de formación de imagen. Por ejemplo, mediante el análisis de efectos polarimétri-

cos es posible obtener información de la estructura o cambios en composición de las muestras. No obstante, casi todos los sistemas de microscopía óptica presentan ciertas similitudes. Existe un conjunto de parámetros que son generalmente abordados al momento de analizar instrumentos formadores de imagen, los cuales son: la magnificación, la resolución y el contraste [1].

La magnificación se refiere a los diferentes aumentos que realiza un sistema óptico sobre su imagen, éstos pueden ser angulares, longitudinales y transversales. El aumento angular se suele utilizar en los sistemas ópticos cuyo receptor final es el ojo humano o la imagen se encuentra proyectada al infinito, y se calcula como una relación entre los ángulos formados por un rayo proveniente de un punto con respecto al eje óptico, con y sin sistema óptico (M_α en Fig. 4-1). La magnificación longitudinal, también llamada magnificación axial, se refiere al desplazamiento que existe entre un par de planos conjugados dado un desplazamiento sobre el eje óptico del sistema (M_L). El aumento trasversal, probablemente el más relevante en los sistemas de microscopía, está asociado a la relación entre las dimensiones de un objeto en un plano normal al eje óptico del sistema con respecto a su imagen (M_T). La magnificación transversal en los sistemas de microscopía suele ser de 4, 10, 20, 40, 60 y 100 aumentos [2]. Un esquema con los diferentes tipos de magnificación se presenta en la Fig. 4-1.

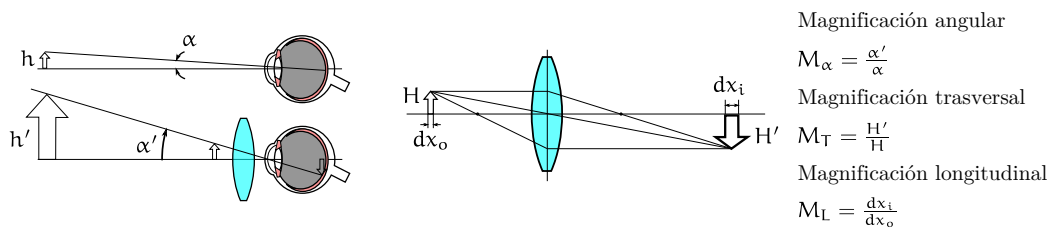


Figura 4-1: Diagrama magnificación angular, transversal y longitudinal.

La resolución es uno de los parámetros más importantes en un microscopio, y se puede definir como la capacidad de un sistema para reproducir las pequeñas estructuras presentes en una muestra. Cuando un sistema óptico tiene su mejor resolución, se dice que el sistema está limitado por difracción, en cuyo caso la resolución se calcula a través de la distancia de Abbe [3], que bajo el criterio de Rayleigh viene dada por:

$$d = \frac{0,61\lambda}{NA_{\text{objetivo}}},$$

donde d es la mínima distancia entre dos puntos que el sistema puede resolver, λ es la longitud de onda de la iluminación utilizada y NA_{objetivo} es la apertura numérica del objetivo. Esta aproximación es válida únicamente cuando la apertura numérica de la iluminación es mayor o igual que la del objetivo [3], en caso contrario se utiliza la siguiente expresión:

$$d = \frac{1,22\lambda}{NA_{\text{condensador}} + NA_{\text{objetivo}}},$$

siendo $NA_{\text{condensador}}$ la apertura numérica de la iluminación. Es importante resaltar que la resolución de un sistema no tiene dependencia de su magnificación, sino de la apertura numérica del objetivo. Se debe considerar que a mayor magnificación será necesario resolver estructuras cada vez más pequeñas, por esto, a medida que aumenta la magnificación del objetivo también lo hace su apertura numérica. Aun así, existen objetivos con pocos aumentos y grandes aperturas numéricas.

Por último, el contraste se refiere a la capacidad de un sistema para generar una imagen en la que sus diferentes estructuras puedan ser fácilmente diferenciables, por supuesto sujeto a la resolución del mismo. Esta suele asociarse a la visibilidad del sistema y se reduce a medida que aumenta la frecuencia de las estructuras observadas por el instrumento. La visibilidad o contraste de una imagen se puede medir a través de la siguiente expresión [4]:

$$\text{Contraste} = \frac{I_{\text{max}} - I_{\text{min}}}{I_{\text{max}} + I_{\text{min}}},$$

donde I_{max} e I_{min} son la máxima y mínima intensidad medidas para un patrón de franjas o una señal sinusoidal.

4.1.1. Componentes principales de un microscopio

Un microscopio puede construirse a partir de un conjunto básico de componentes, los cuales deben ser combinados en un sistema mecánicamente estable. Los componentes necesarios para la construcción de un microscopio a transmisión convencional son el sistema de iluminación, la montura que permite ubicar y desplazar la muestra, el objetivo que hace la magnificación principal del sistema y el ocular que permite llevar la imagen del objeto al ojo o una cámara. Un esquema de un microscopio a transmisión se presenta en la Fig. 4-2.

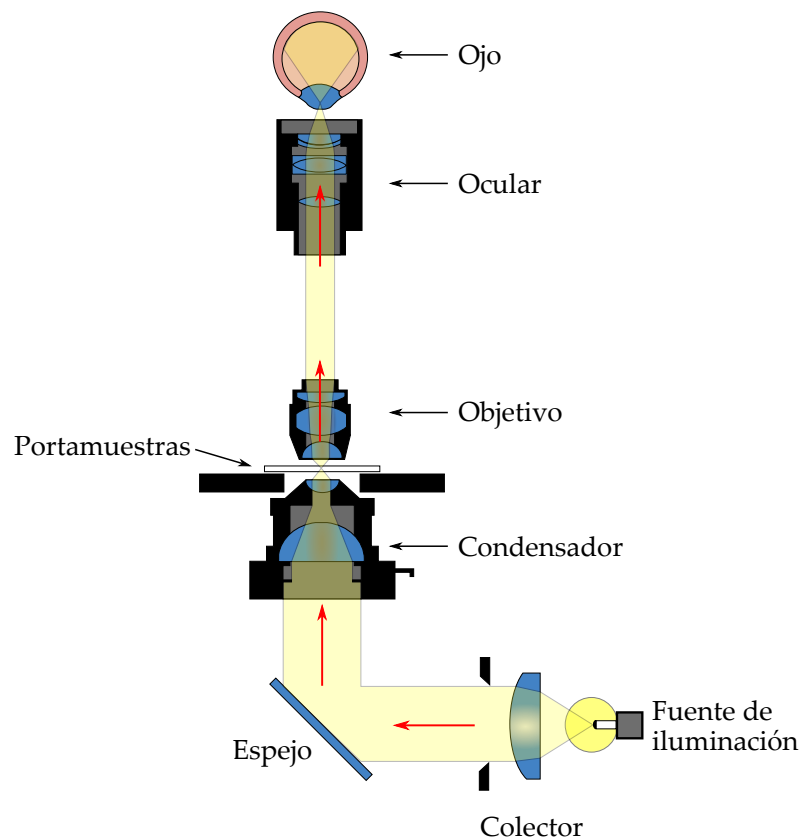


Figura 4-2: Esquema básico de un microscopio a transmisión.

Sistema de iluminación

La función del sistema de iluminación es proveer la radiación electromagnética que interactuará con la muestra bajo las especificaciones requeridas por cada técnica, en consecuencia existen muchos tipos de fuentes, por ejemplo lámparas de tungsteno,

fuentes LED, fuentes en el espectro ultravioleta e infrarrojo, fuentes coherentes, incoherentes, polarizadas, entre otras. En los sistemas de iluminación es necesario llevar la luz desde la fuente hasta la muestra e iluminarla con un cono de luz tal que la resolución del sistema sea la mayor posible, el elemento encargado de colectar la luz sobre la muestra se conoce como condensador. Existen diferentes diseños de sistemas de iluminación, entre los que destaca el iluminador de Koehler el cual se utiliza cuando se desea iluminar un objeto con un campo extendido y uniforme [5]. Más adelante se hará énfasis en las características y consideraciones de diseño de un iluminador de Koehler.

Montura

La montura proporciona soporte al espécimen. Para la mayoría de los microscopios biológicos, una montura que puede moverse en el sistema coordenado (x, y, z) es suficiente. Para aplicaciones que requieren mediciones angulares y microscopía de luz polarizada convencional, la posibilidad de rotar en el plano $x-y$ es una necesidad [3].

Objetivo

El componente óptico más importante de un microscopio es el objetivo, el cual está compuesto por un conjunto de lentes individuales combinadas dentro de un ensamblaje compacto. Las múltiples lentes se colocan en una disposición específica para reducir tanto aberraciones esféricas como cromáticas y permitir un campo de visión plano. Los tres tipos principales de objetivos son los acromáticos, las fluoritas y los apocromáticos, los cuales se diferencian en el número de longitudes de ondas para los que están optimizados [3]. Adicionalmente, existe otro tipo de clasificación en los objetivos, estos pueden ser secos o de inmersión y de óptica finita o infinita. Esta primera clasificación se refiere al medio presente entre el cubre muestra y el objetivo, donde seco se refiere a aire y de inmersión generalmente un aceite o glicerina. Los objetivos de inmersión suelen presentar grandes aperturas numéricas, por lo que se utilizan cuando se necesita muy alta resolución. La segunda clasificación se refiere a si el objetivo genera directamente una imagen de la muestra o una proyección al infinito

que debe ser colectada por otra lente [5], permitiendo ubicar elementos adicionales en el camino de la luz. Los objetivos de microscopio poseen una corta profundidad de foco, esto garantiza que la imagen obtenida con este presenta la información contenida en el plano de enfoque $\pm 6\mu\text{m}$, correspondientes a la profundidad de foco para un objetivo de 10X [6]; la profundidad de foco disminuye a medida que aumenta la apertura numérica de los objetivos.

Ocular

El ocular es un elemento de integración que realiza la función de llevar la imagen generada por el objetivo de microscopio al sistema de adquisición de imagen, sea este el ojo o una cámara. Sin embargo, el ocular no es estrictamente necesario cuando se usa una cámara como medio de adquisición. Debido a que el ocular es a su vez otro sistema óptico, es normal que éste pueda producir una magnificación adicional, por esto, aunque en un microscopio se tenga un objetivo de 10 aumentos, la imagen observada puede tener varios más. Al seleccionar un ocular, se deben evaluar dos requisitos: el campo de visión (*Field Of View* FOV) y el aumento. La magnificación máxima de un sistema óptico debe ser de 500 a 1000 veces su apertura numérica. El ocular debe ser elegido para no exceder este requisito y debe tener una magnificación menor al objetivo [3]. Cuando un objetivo posee óptica corregida al infinito, es estrictamente necesario utilizar una segunda lente para formar imagen, en este caso el mismo ocular puede ser utilizado.

4.1.2. Microscopio a reflexión

En las técnicas de microscopia a transmisión, la información obtenida es aquella relacionada a la luz que logra pasar a través de la muestra y normalmente se encuentra asociada a los efectos de absorbanza y esparcimiento presentados por la muestra. En un microscopio a reflexión la información obtenida es aquella debida a procesos de retro-esparcimiento y reflexión especular en las superficies de la muestra [7]. En lo referente a la manera en la que se obtiene la imagen, ambos sistemas funcionan de igual

forma, la diferencia se encuentra en el sistema de iluminación. En un microscopio a reflexión, la luz que ilumina la muestra sigue el mismo camino que se utiliza para hacer imagen, como se presenta en la Fig. 4-3, de manera que el objetivo cumple también la función de condensador; de esta forma la apertura numérica de la iluminación será igual a la del objetivo y asegurará la máxima resolución del sistema. Las muestras para microscopía a reflexión deben ser reflexivas para poder realizar una buena imagen en campo claro de la muestra (aproximadamente una reflectividad del 0,5%) [8]. En algunas técnicas como la microscopía de fluorescencia o confocal, las muestras deben observarse a reflexión [5].

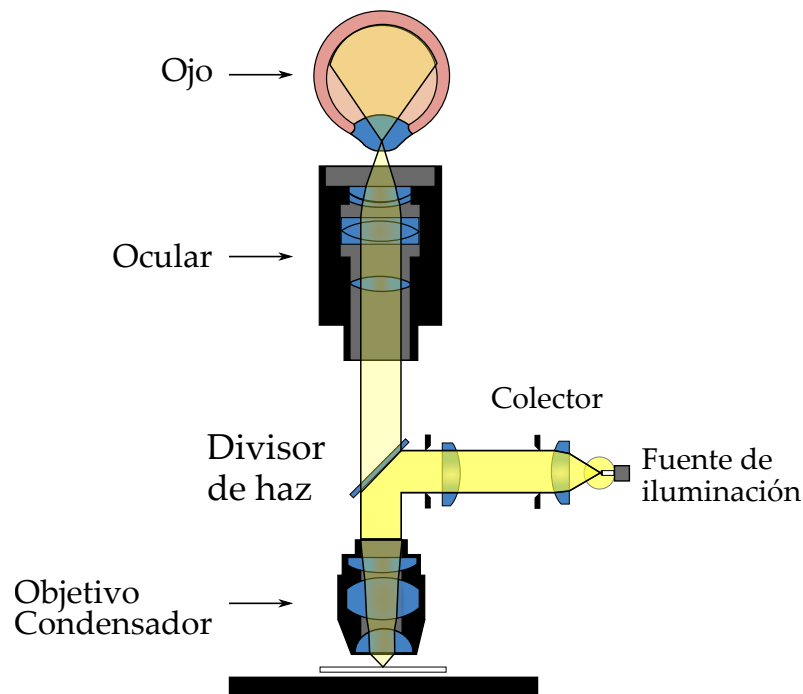


Figura 4-3: Esquema básico de un microscopio a reflexión.

4.2. Consideraciones de diseño

Cuando se desea diseñar un sistema óptico es necesario tomar dentro de consideración diferentes aspectos dependiendo de la aplicación. En un sistema formador de imagen es importante tener presente las diferentes fuentes de aberraciones ópticas, además de cualquier otra restricción propia de las técnicas a utilizar. Ya que se desea

implementar un sistema de microscopía de luz polarizada, es necesario tomar dentro de consideración los posibles efectos polarimétricos que presente la óptica a utilizar. Para la implementación del sistema se cuenta con los recursos de laboratorio del Grupo de Óptica Aplicada de la Universidad EAFIT, lo cual constituye un primer criterio de diseño ya que solo se utilizaron con los instrumentos a disposición del grupo, aunque como se presentará se tiene acceso una gran variedad de elementos ópticos y mecánicos. A continuación, se listan las especificaciones del microscopio y sobre ellas se evaluarán los respectivos requerimientos sobre los sistemas de iluminación y formación de imagen.

- El microscopio permitirá observar muestras a transmisión y reflexión.
- El microscopio funcionará en modo de campo claro, sobre muestras extendidas.
- El dispositivo constará con un sistema automatizado para la generación y análisis de estados de polarización.
- El microscopio estará en modo invertido.

4.2.1. Estructura mecánica

Para la implementación de cualquier sistema óptico es necesario tomar dentro de consideración la estructura sobre la que se realizará el montaje. El laboratorio cuenta con una estructura (THORLABS microscope body) que permite acoplar un objetivo de microscopio en posición vertical tal y como se presenta en la Fig. 4-4. Esta estructura permite iluminar la muestra por debajo o por arriba, lo que hace posible observar muestras a transmisión y reflexión. Debido a que la entrada para la iluminación a transmisión se encuentra por encima del nivel base del montaje, se utilizó un periscopio para subir el nivel de la iluminación.

Los demás elementos ópticos utilizados en los sistemas de iluminación y formación de imagen se montaron en postes, monturas de postes, portales, entre otros (THORLABS *optomechanical components*). Para la generación y análisis de estados de polarización se utilizó un sistema de rotación desarrollado por el laboratorio. En

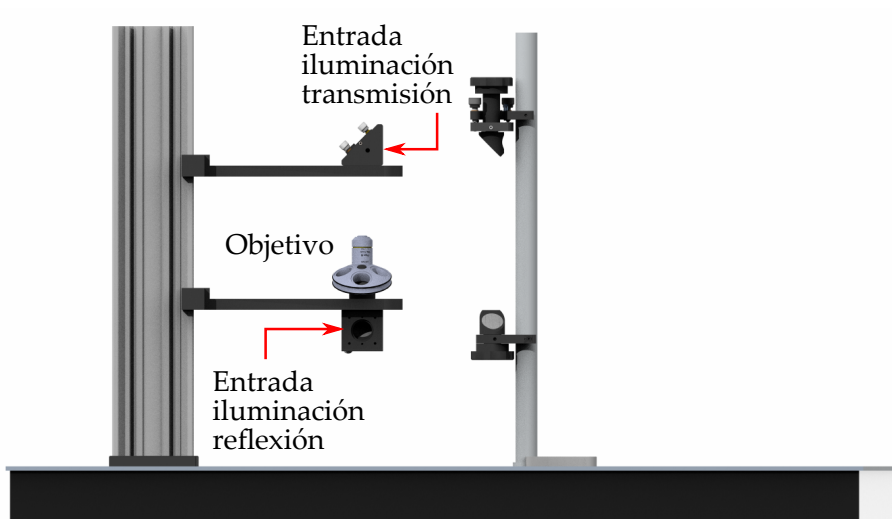


Figura 4-4: Estructura para el montaje del microscopio.

la Fig. 4-5 se presenta el sistema de rotación, el cual utiliza un motor paso a paso como actuador. La transmisión de movimiento entre el motor y el elemento montado se realiza mediante un sistema de polea. El rotador es controlado a través de un Arduino Leonardo, y las ordenes son transmitidas mediante comunicación serial. El grupo de investigación ha programado en LabVIEW una plataforma para la calibración del sistema de rotación bajo el registro de software [9]. Además, se ha programado una rutina en Matlab para facilitar el control y adquisición de datos en el sistema.

El laboratorio cuenta con cuatro rotadores, dos de ellos se utilizan en el PSA y los otros dos se ubican en el correspondiente sistema de iluminación, transmisión o reflexión como PSG. Los cuatro rotadores cuentan con diferente resolución, pero todas están por debajo de 0.5° . Al llevar el elemento a un ángulo deseado este puede tener un error correspondiente a su resolución, sin embargo, esta condición es tolerable en medidas polarimétricas.

4.2.2. Sistema de iluminación

Debido a que el microscopio funciona en modo a transmisión y reflexión, se diseñó un sistema de iluminación para cada uno. En ambos casos las muestras a observar corresponden a objetos extendidos en los que se desea tener un campo de ilumina-

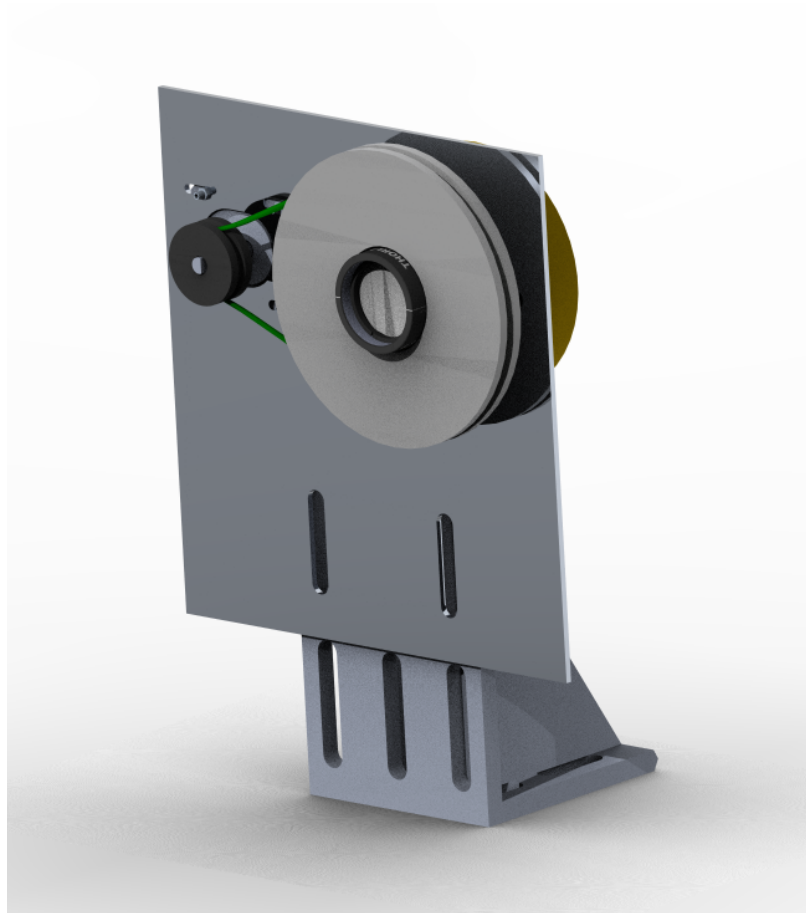


Figura 4-5: Sistema de rotación para PSA y PSG.

ción homogéneo en el plano de enfoque. En consecuencia, se utilizó el modelo del iluminador de Koehler como base para el diseño.

Iluminador de Koehler

El iluminador de Koehler nace como una solución alternativa al método de iluminación crítica, en el que se hace imagen de la fuente de luz sobre el plano de enfoque de la muestra [7, 10]. En la Fig. 4-6 se presenta el esquema básico de un iluminador de Koehler. Este está compuesto por una fuente de luz, seguido por una primera lente denominada colector, un par de aperturas físicas y una segunda lente llamada condensador. La apertura A funciona como apertura de *Stop* cuando se analiza el sistema óptico tomando la fuente como objeto, no obstante, debido a que el iluminador de Koehler termina haciendo imagen de esta apertura en su plano imagen, se le suele

denominar apertura de campo del iluminador, ya que esta define el área del plano de iluminación, mientras que a la apertura B se le considera apertura de *Stop* debido a que esta limita la cantidad de energía que llega al plano de iluminación, esta notación de las aperturas es la que se sigue en este documento.

El colector cumple la función de recoger la mayor cantidad de luz posible proveniente de la fuente de luz y hacer imagen de ésta en su plano conjugado, sobre el cual se ubica la apertura *Stop*. Típicamente, se busca que la apertura numérica del colector sea grande, de manera que el cono de luz colectado permita aprovechar la mayor cantidad de potencia. La apertura de campo se ubica a la distancia focal del colector de forma que rayos de luz provenientes de cada punto de la fuente contribuyen para iluminar toda el área de la apertura de campo, similar a como se plantea en los modelos de sistemas telecéntricos [10]. Luego, cada punto de la apertura está conformado por rayos provenientes de toda la fuente, pero cada punto recibe únicamente una porción de la intensidad generando un campo de iluminación homogéneo. La uniformidad de la iluminación dependerá de la geometría de la fuente, esto se puede solventar ubicando un difusor justo después de la fuente [11]. El condensador se ubica a su distancia focal de la apertura *Stop*, para así, enviar la imagen de la fuente hacia el infinito y evitar que esta se superponga con la imagen de la muestra. Además, luego del condensador se encuentra el plano objeto sobre el que se colocará la muestra, este corresponde al plano conjugado de la apertura de campo. Sobre el plano objeto se encuentra una imagen del campo de iluminación homogéneo presente en la apertura de campo, y este se utiliza para iluminar la muestra.

Si la forma de la fuente de luz no cambia dependiendo de su intensidad, se puede no utilizar un *Stop* físico en el sistema y en su lugar variar el voltaje de alimentación. En ocasiones el recorrido que debe de realizar la luz desde la fuente hasta la muestra es muy largo o es necesario ubicar elementos adicionales en el sistema de iluminación, para esto existe una versión modificada del iluminador que utiliza una lente adicional denominada *relay* [10]. En la Fig. 4-7 se presenta un iluminador con *relay*, que como se puede observar presenta ciertas diferencias con respecto al iluminador de Koehler básico. En esta segunda configuración del iluminador, el colector se ubica a su distan-

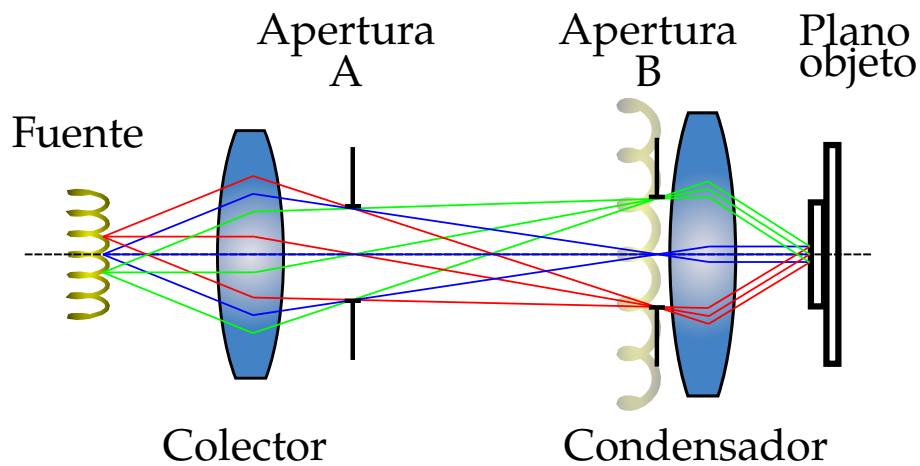


Figura 4-6: Esquema básico de un iluminador de Koehler.

cia focal de la fuente de luz enviando su imagen al infinito y colimando parcialmente la luz. En este tramo es posible ubicar elementos adicionales como polarizadores o láminas retardadoras. La lente de *relay* se ubica a su focal de la apertura de campo, permitiendo generar una imagen intermedia de la fuente y enviando la imagen de la apertura de campo al infinito. Finalmente, el condensador envía la imagen de la fuente al infinito y genera una imagen de la apertura de campo a su distancia focal.

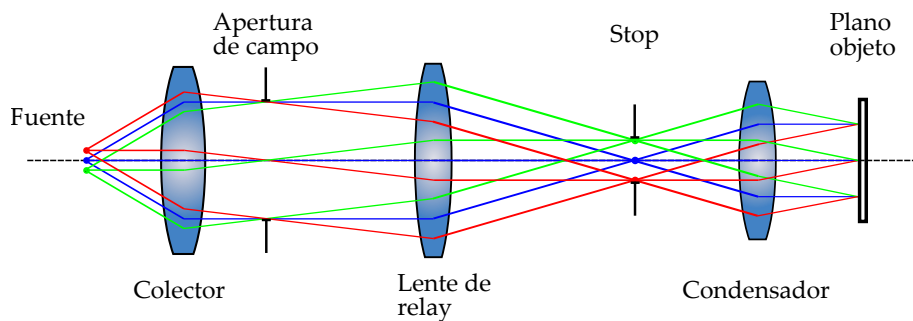


Figura 4-7: Esquema de un iluminador de Koehler con lente de *relay*.

Fuente de iluminación

La selección de la fuente de iluminación es una de las tareas más importantes en la etapa de diseño de un sistema de microscopía, dado que cada técnica tiene sus propias restricciones. Las técnicas de microscopía de luz polarizada pueden aplicarse en una gran variedad de instrumentos, por ejemplo, los microscopios de campo claro,

coherencia óptica, fluorescencia, confocales u óptica no líneal, en los cuales las fuentes de iluminación varían desde lámparas halógenas hasta láseres pulsados [1]. En este trabajo, el microscopio implementado pertenece a la familia de las técnicas de campo claro, en las que se utilizan fuentes parcialmente coherentes [12]. Además, debido a que se realizarán medidas cuantitativas basadas en los modelos presentados en el Capítulo 2, la luz debe ser cuasi-monocromática.

4.2.3. Formación de imagen

Todos los elementos ubicados posterior a la muestra hacen parte del sistema de formación de imagen. El objetivo de microscopio es el primero de ellos y quien realiza la magnificación principal del sistema. Los objetivos con los que cuenta el laboratorio son de corrección finita, por lo que no es necesario utilizar una segunda lente para la formación de la imagen. Los microscopios de las diferentes marcas presentan distintas distancias de tubo, que corresponde a la distancia en que el objetivo forma imagen cuando la muestra se encuentra a la distancia de trabajo. La imagen puede tomarse a una distancia diferente, pero en dicho caso, la magnificación no será la reportada por el fabricante, además de introducir algunas aberraciones. Las distancias de tubo suelen ir de 160mm a 200mm desde la parte posterior del objetivo. En el laboratorio se tienen objetivos de microscopio con distancia de tubo de 160mm y 180mm. La distancia imagen que se utilizó en el montaje es de 180mm para así asegurar que las magnificaciones obtenidas serán iguales o superiores a las reportadas por el fabricante.

Debido a que el microscopio presenta iluminación a reflexión no es posible tomar directamente la imagen generada por el objetivo, ya que la cámara interferiría con el camino de la luz. Además, se necesita espacio adicional para implementar un PSA. Una segunda lente debe utilizarse para llevar la imagen de la muestra hasta la cámara, introduciendo la menor cantidad de aberraciones en el sistema o magnificación adicional. Un sistema 2F permite generar una imagen sin magnificación [10], mientras la luz recorre una distancia equivalente a dos veces la distancia focal de la lente utilizada, dando espacio para la instalación del sistema PSA. Los dobletes ópticos están conformados por un par de lentes, seleccionadas para compensar las aberraciones

cromáticas. Además, los dobletes suelen estar diseñados para sistemas con proyección al infinito, en donde suelen presentar muy pocas aberraciones geométricas por lo que tienen un mejor desempeño que una lente simple.

4.2.4. Polarización en sistemas formadores de imagen

Las fuentes más comunes de efectos polarimétricos en los sistemas ópticos son: los efectos de Fresnel, películas delgadas o recubrimientos, el dicroísmo, materiales birrefringentes y birrefringencia por esfuerzo [13]. El esparcimiento es otra fuente de cambios en la polarización que suele presentarse con frecuencia en la naturaleza, normalmente asociada a efectos de despolarización. Sin embargo, esta rara vez tiene un impacto considerable en el desempeño de sistemas ópticos, donde se da debido a inhomogeneidades en la composición del material o no uniformidad en los recubrimientos, procesos que difícilmente pueden controlarse al 100 % y generan centros dispersores, asociados a burbujas de aire o concentraciones irregulares de material [7]. A pesar de que los efectos de esparcimiento suelen ser de gran utilidad al realizar medidas polarimétricas, son difíciles de analizar y controlar en los sistemas formadores de imagen, por lo que generalmente se ignoran o abordan en procesos de calibración [13].

Una de las causas de efectos polarimétricos no deseados es la birrefringencia por esfuerzo, que suele evitarse mediante la selección de vidrios libres de estrés, los cuales son materiales que presentan un bajo coeficiente de estrés óptico; por lo que pequeñas cargas no generan cambios apreciables en la polarización [14]. Adicionalmente, un apropiado diseño de la mecánica del sistema permite reducir al máximo las cargas sobre los elementos ópticos. La mayoría de los efectos de birrefringencia por esfuerzo en lentes suelen presentarse en la periferia de estas, en donde se realiza la sujeción, por lo que es posible limitar el tamaño de la pupila del sistema para evitar esta región [14].

Muchas de las superficies ópticas presentes en los elementos utilizados en sistemas formadores de imagen presentan algún tipo de recubrimiento, para mejorar o disminuir la reflexión/transmisión, separar la luz por longitud de onda o por estado de polarización. Generalmente todos los recubrimientos presentan efectos polarimétricos,

en consecuencia, una lente con recubrimientos suele presentar cambios en la polarización de la luz dependiendo de su diseño [15]. La mayoría de los recubrimientos ópticos están diseñados para minimizar pérdidas en la intensidad de la luz, ya sea reduciendo la reflectancia en superficies refractivas o potenciándola en superficies reflectivas, sin considerar los retardos de fase que se pueden introducir. Típicamente, aminorar las perdidas de intensidad requiere generar un desfase proporcional sobre la luz, el cual generalmente cambia para las diferentes componentes del campo eléctrico, introduciendo birrefringencia [7].

Por otro lado, cuando las superficies no presentan recubrimientos, los coeficientes de Fresnel dan cuenta de los efectos polarimétricos que se dan en las interfaces entre los medios [13]. Cuando la luz incide sobre un medio en una dirección diferente a la normal de la superficie, las componentes ortogonales del campo eléctrico que inciden con polarización paralela y ortogonal a la interfaz, presentan diferentes coeficientes de transmisión y reflexión. A la componente perpendicular a la superficie se le suele denotar mediante una *s* y a la paralela con una *p*. Los coeficientes de transmisión *T* y reflexión *R* están en función del ángulo de incidencia de la luz y los índices de refracción de los medios, estos vienen dados por:

$$T_s(\alpha_1) = \frac{n_2 \cos \alpha_2}{n_1 \cos \alpha_1} \left| \frac{2n_1 \cos \alpha_1}{n_1 \cos \alpha_1 + n_2 \cos \alpha_2} \right|^2,$$

$$T_p(\alpha_1) = \frac{n_2 \cos \alpha_2}{n_1 \cos \alpha_1} \left| \frac{2n_1 \cos \alpha_1}{n_2 \cos \alpha_1 + n_1 \cos \alpha_2} \right|^2,$$

$$R_s(\alpha_1) = \left| \frac{n_1 \cos \alpha_1 - n_2 \cos \alpha_2}{n_1 \cos \alpha_1 + n_2 \cos \alpha_2} \right|^2,$$

$$R_p(\alpha_1) = \left| \frac{n_2 \cos \alpha_1 - n_1 \cos \alpha_2}{n_2 \cos \alpha_1 + n_1 \cos \alpha_2} \right|^2,$$

donde n_1 y n_2 son los índices de refracción de los medios que componen la interfaz en la que se refleja y refracta la luz. α_1 y α_2 son los ángulos de incidencia y refracción calculados acorde a la ley de Snell ($n_1 \sin \alpha_1 = n_2 \sin \alpha_2$). Además, por conservación

de la energía e ignorando efectos de absorbanza $T_s = 1 - R_s$ y $T_p = 1 - R_p$ [7]. En la Fig. 4-8 se presenta una curva transmitancia para las componentes s y p de la luz, en las que se puede observar que en un ángulo de incidencia normal $\alpha_1 = 0$ la intensidad transmitida para s y p es igual. A medida que el ángulo de incidencia incrementa, la componente s decae, mientras que la componente p incrementa hasta llegar a 100% y luego decae. El ángulo en el que la transmitancia en p es total se conoce como ángulo de Brewster y se caracteriza porque la luz reflejada presenta únicamente polarización en s.

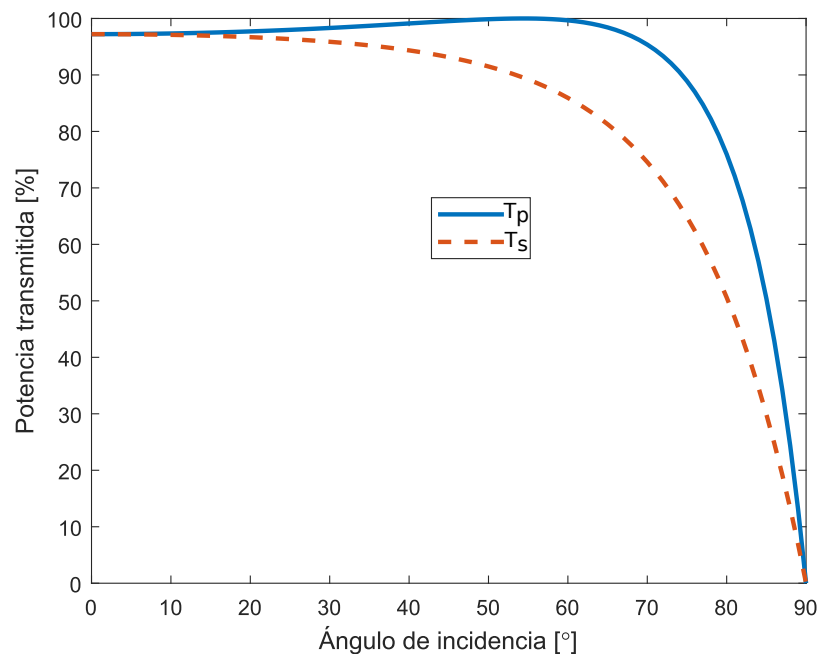


Figura 4-8: Curva de transmitancia por cambio de medio en función del ángulo de incidencia para un par de estados de polarización T_p y T_s .

La presencia de diferentes transmitancias en el medio está explícitamente relacionada a la diatenuación, esta puede determinarse a partir de la Eq. 2.26, donde en lugar de utilizar las intensidades máxima y mínima para un par de estados ortogonales se utiliza las reflectancias y transmitancias en s y p respectivamente. La Fig. 4-9, presenta una curva de diatenuación en función del ángulo de incidencia para la componente transmitida y reflejada. En la gráfica se puede observar que la diatenuación de la componente reflejada incrementa rápidamente hasta alcanzar el ángulo

de Brewster, mientras que la componente transmitida incrementa más lentamente. Para ángulos de incidencia inferiores a 40° los efectos de diatenuación a transmisión son bajos para sistemas formadores de imagen polarimétrica, por otro lado, la diatenuación a reflectancia presenta un efecto más grande, de allí que los espejos generen mayores cambios en la polarización de la luz que las lentes.

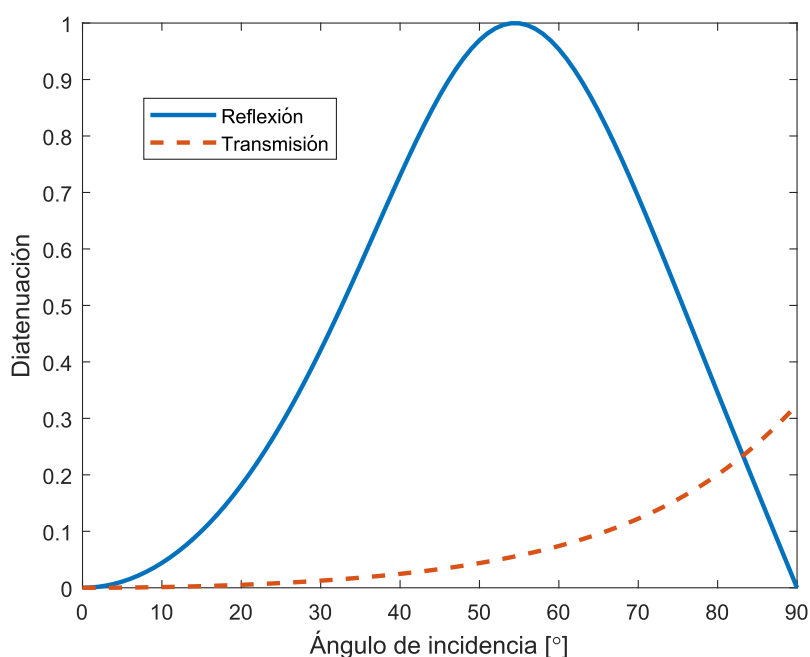


Figura 4-9: Curva de diatenuación por efectos de Fresnel en función del ángulo de incidencia, para las componentes transmitida y reflejada.

Debido a que para una superficie esférica sus direcciones normales cambian punto a punto, es necesario considerar que los elementos puede introducir cambios en la polarización a medida que nos alejamos radialmente de su eje óptico, o angularmente con respecto al estado de polarización de la luz. Una representación basada en la notación de Jones fue propuesta por Shribak en [16], esta permite determinar la matriz de Jones de una superficie para un par de coordenadas ρ y θ (coordenadas polares) sobre la apertura de una lente. Esta ecuación viene dada por:

$$\mathbf{J}(\rho, \theta) = \begin{bmatrix} \cos\theta & -\text{sen}\theta \\ \text{sen}\theta & \cos\theta \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} T_p(\rho)\exp[i\Delta_p(\rho)] & 0 \\ 0 & T_s(\rho)\exp[i\Delta_s(\rho)] \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \cos\theta & \text{sen}\theta \\ -\text{sen}\theta & \cos\theta \end{bmatrix}$$

donde los desfases Δ_p y Δ_s suelen ser cero para superficies sin recubrimientos, implicando que la matriz $\mathbf{J}(\rho, \theta)$ es un diatenuador rotado que actúa de manera similar a un polarizador. Cuando la superficie tiene recubrimientos suelen aparecer efectos de retardancia asociados a las técnicas utilizadas para la fabricación de estos. Los desfases Δ_p y Δ_s se calculan como la parte compleja de los coeficientes de Fresnel y suelen ser más grandes a reflexión que transmisión [17]. Generalmente, mayores efectos de retardo producen una menor diatenuación, por ende, algunos recubrimientos pueden ser diseñados para compensar efectos de retardo o diatenuación en las superficies de los elementos ópticos [17].

4.3. Diseño y Simulación

Previo a la implementación del microscopio, se llevó a cabo una etapa de diseño y simulación atendiendo a las consideraciones de los tópicos discutidos en secciones previas. Para este propósito se utiliza el software OpticStudio 16 de Zemax. Este programa de simulación óptica, emplea conceptos de óptica geométrica para trazado de rayos y teoría de óptica física con el fin de facilitar la modelación de una gran variedad de sistemas ópticos, entre los que se encuentran sistemas de iluminación, formación de imagen, interferometría, polarimetría, entre otros. Además, posee una amplia base de datos con las características de diferentes tipos de lentes, con sus recubrimientos, lo que facilita la realización de diseños utilizando elementos comerciales. Adicionalmente, OpticStudio permite realizar procesos de optimización, facilitando efectuar ajustes finos sobre los diseños, o determinar la posición de los componentes basado en premisas básicas de la composición de los sistemas. A continuación, se presentará el diseño de cada uno de los subsistemas que componen el microscopio.

4.3.1. Sistema de iluminación

Dos sistemas de iluminación han sido diseñados con base en el modelo del iluminador de Koehler, utilizando una lente de *relay* en ambos para aumentar el recorrido de la luz y permitir el montaje de componentes intermedios.

Iluminación a transmisión

El diseño de este sistema de iluminación requiere tener dentro de consideración cuatro aspectos fundamentales: el ángulo de colección de luz proveniente de la fuente, la distancia desde la fuente de iluminación a la muestra, la posibilidad de introducir componentes adicionales en el recorrido de la luz y la apertura numérica de la iluminación.

Usualmente el colector es una lente o conjunto de lentes, con una apertura numérica grande. La función principal del colector como lo indica su nombre, es reunir la mayor cantidad de luz proveniente de la fuente, a fin de que la iluminación sobre la muestra sea lo suficientemente intensa para generar buen contraste. En una fuente de luz con baja potencia es muy importante que el ángulo de colección sea lo más grande posible, pero cuando la potencia de la fuente es grande se puede ser un poco más flexible y simplificar el diseño del condensador, a cambio de una pérdida en la intensidad máxima de la iluminación. Una lente de 1" de diámetro y 100 mm de focal se utilizó como colector (Edmund Optics 32718). Con esta la potencia captada es de aproximadamente el 0,78 % de la potencia total de la fuente. Como se observa en la Fig. 4-10 el colector toma la luz proveniente de la fuente y la lleva a la pupila de campo del sistema¹, donde cada punto del campo de iluminación está formado por contribuciones de cada punto de la fuente, dándole así homogeneidad al campo de iluminación.

La longitud del iluminador se puede controlar a partir de la lente de *relay*. Mientras mayor sea la focal de la lente, mayor será la longitud del iluminador. Ya que se desea

¹Recordemos que en los sistemas de iluminación de Koehler, a la primera apertura ubicada luego del colector se le denomina apertura de campo, ya que esta limita el área del campo de iluminación generado por el sistema.

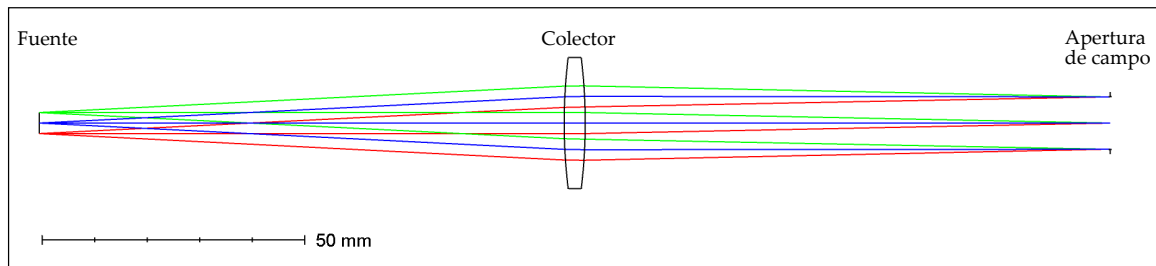


Figura 4-10: Trazado de rayos colector a transmisión. Lente de colección Edmund Optics 32718

iluminar la muestra desde arriba, un periscopio se utiliza para subir la altura de la iluminación. El recorrido desde el primer espejo del periscopio hasta el condensador es de aproximadamente 410 mm, por lo que se utiliza una lente de 400 mm de focal como *relay* (Edmund Optics 32893). Con esta configuración se logra generar un camino de 1.0462 m de longitud para todo el sistema, en donde los primeros 600 mm pueden ser utilizados para ubicar elementos adicionales. En la Fig. 4-11 se puede observar el trazado de rayos desde la apertura de campo del sistema hasta el punto en el que se hace imagen de la fuente. La región comprendida entre la apertura y la lente de *relay* es de un poco menos de 400 mm y puede utilizarse para ubicar elementos adicionales sin cortar luz, siempre y cuando la apertura de estos no sea menor a una pulgada.

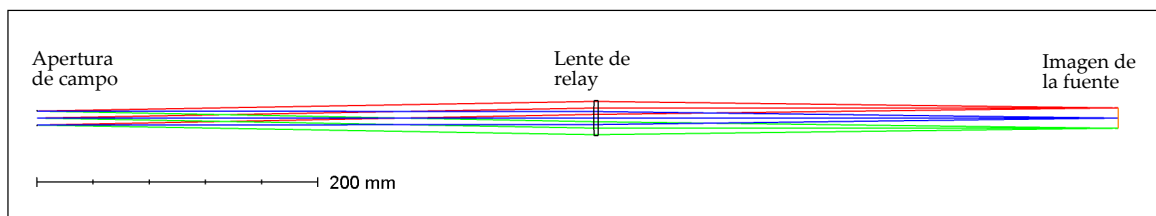


Figura 4-11: Trazado de rayos lente de *relay* a transmisión. Lente de relay Edmund Optics 32893

Para obtener una gran apertura numérica en la iluminación se requiere que el condensador tenga una distancia focal corta y un diámetro de lente grande. Esto normalmente se logra mediante la combinación de diferentes lentes en un sistema compacto con una distancia focal de algunos cuantos milímetros. Existen diferentes diseños de condensadores, sin embargo, estos no pueden ser fácilmente replicados ya que están conformados por lentes poco convencionales. En consecuencia, se decide

utilizar la lente de focal más corta con la que se cuenta, una lente de 25 mm de focal y 1" de diámetro (Edmund Optics 32490). La máxima apertura numérica que se puede obtener con esta lente sería de 0,44. En la Fig. 4-12, se observa el trazado de rayos desde la imagen de la fuente que forma la lente de *relay*, hasta el plano de iluminación de la muestra. Como se observa, la imagen de la fuente se envía al infinito, mientras se forma imagen de la apertura de campo.

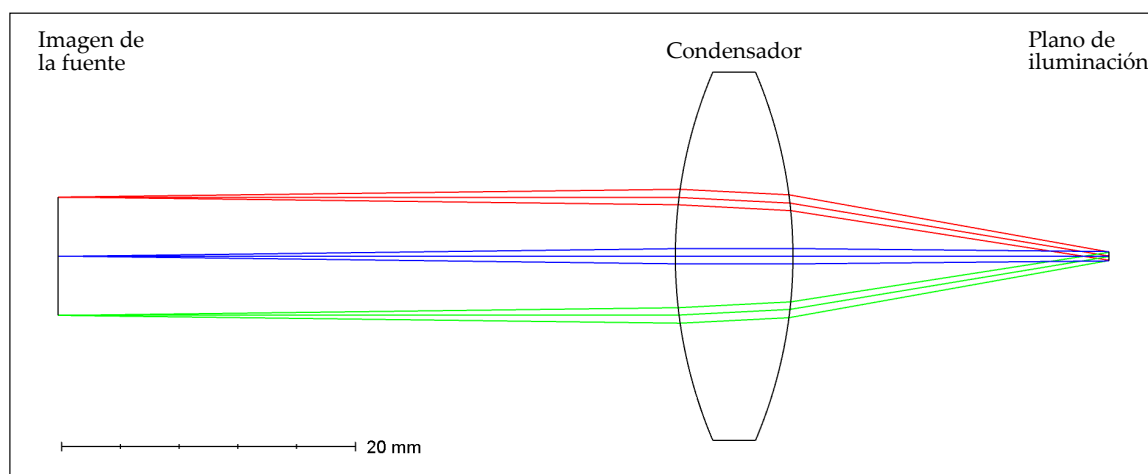
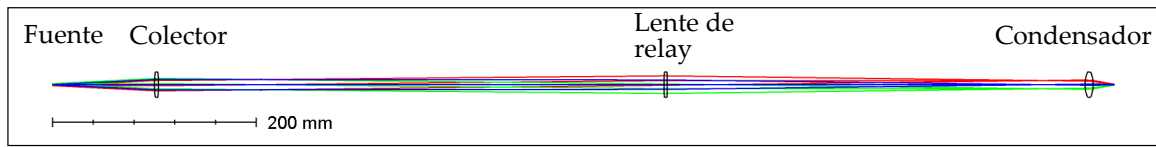


Figura 4-12: Trazado de rayos condensador a transmisión. Lente condensador Edmund Optics 32490

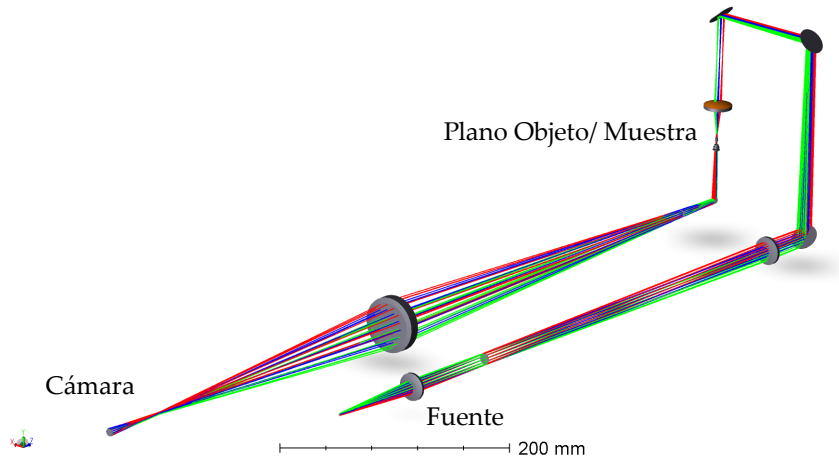
En la Fig. 4-13(a) se presenta el trazado de rayos total del sistema. La apertura numérica a la entrada es de 0.12 y de 0.325 en el condensador. El diámetro del área de iluminación homogénea es de aproximadamente 0.84 mm. En la Fig. 4-13(b) se presenta el sistema de iluminación con espejos ya en formato compacto.

Iluminación a reflexión

En este sistema el objetivo de microscopio actúa como condensador, así que la lente de *relay* debe generar un campo de iluminación a la distancia de tubo del objetivo, ya que estos son de óptica finita. Se debe realizar una modificación sobre el sistema de *relay* presentado en la sección 4.2.2, dado que la imagen del campo de iluminación no puede ser enviada al infinito. Se selecciona la ubicación de la lente de *relay* de manera que el campo de iluminación esté ubicado a la distancia de tubo del objetivo y la imagen de la fuente posterior a ésta, asegurando así, que la imagen de la fuente



(a) Trazado de rayos del sistema de iluminación a transmisión.



(b) Representación 3D del microscopio a transmisión.

Figura 4-13: Sistema de iluminación a transmisión.

de luz no se superponga con la de la muestra. Como colector, se utiliza una lente de 2" de diámetro y focal de 125 mm (THORLABS LA1384) ubicada a 250 mm de la fuente, formado un sistema $2f$ y generando una imagen de la fuente a 250 mm de la lente. En la Fig. 4-14 se presenta el trazado de rayos del colector desde la fuente hasta la apertura de campo que se encuentra a 125 mm de la lente.

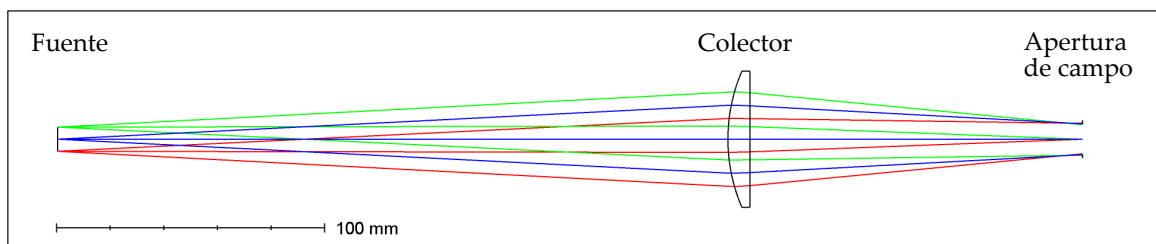


Figura 4-14: Trazado de rayos colector a reflexión. Lente de colección THORLABS LA1384

La lente de *relay* empleada es un doblete de 1" y 100 mm de focal (THORLABS AC254-100-A). En la Fig. 4-15 aprecia el trazado de rayos desde la apertura de campo hasta el plano imagen del objetivo. Entre la apertura y la lente se tiene una imagen

intermedia de la fuente, sin embargo, esta no interfiere con el plano de iluminación, el cual será llevado por el objetivo hasta la muestra. El recorrido entre la apertura y la lente de *relay* puede ser utilizado para ubicar elementos adicionales.

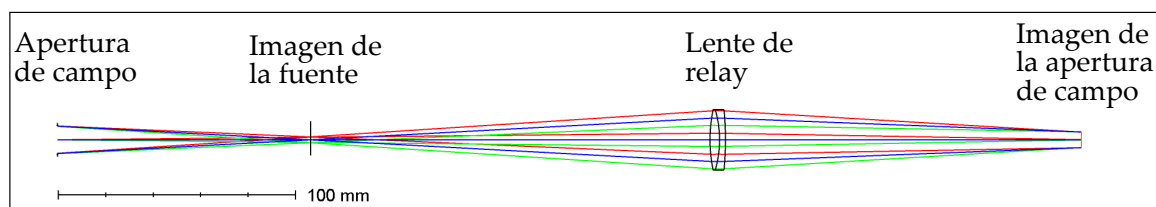


Figura 4-15: Trazado de rayos lente de *relay* a transmisión. Lente de relay THORLABS AC254-100-A

Ya que no se conocen las especificaciones por superficie de los objetivos del laboratorio, un objetivo de 10x descrito por [18] se utiliza para modelar el condensador. En la Fig. 4-16, se presenta el trazado de rayos del condensador desde el plano imagen del objetivo hasta su plano objeto. Como se observa una nueva imagen intermedia de la fuente aparece antes del objetivo, no obstante, esta se encuentra relativamente cerca a la focal del objetivo por lo que su imagen es enviada lejos del plano de iluminación.

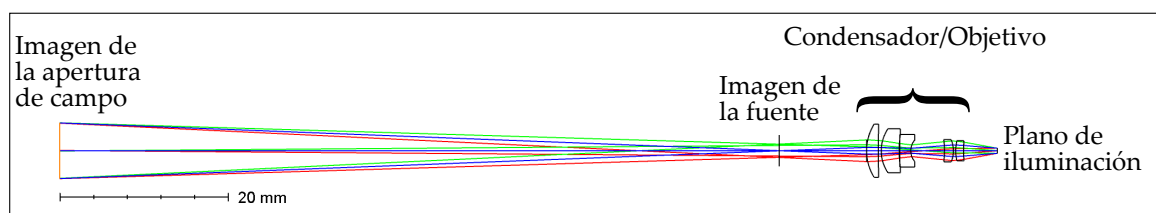
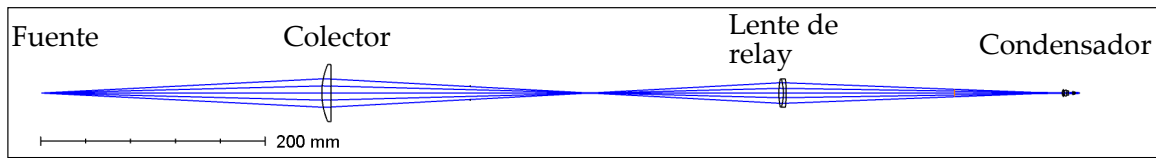
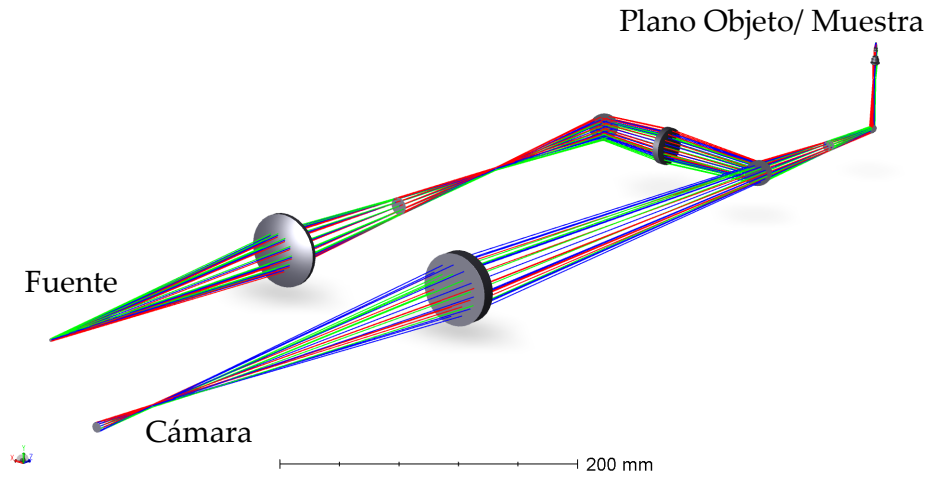


Figura 4-16: Trazado de rayos condensador a reflexión.

En la Fig. 4-17(a) se presenta el trazado de rayos de todo el sistema de iluminación a reflexión. La apertura numérica de entrada es de 0.07 y a la salida es la misma del objetivo, lo cual representa una ventaja de este sistema con respecto al modelo a transmisión. La longitud total del sistema es de 925,278mm. En la Fig. 4-17(b) se presenta el sistema de iluminación con espejos ya en formato compacto.



(a) Trazado de rayos del sistema de iluminación a reflexión.



(b) Representación 3D del microscopio a reflexión.

Figura 4-17: Sistema de iluminación a reflexión.

4.3.2. Formación de imagen

Como se ha mencionado en secciones anteriores, el objetivo de microscopio es el encargado de realizar la magnificación principal del sistema y el primero en hacer imagen de la muestra. Modelar un objetivo de microscopio requiere tomar dentro de consideración muchos aspectos que no son fácilmente caracterizables, además las especificaciones por superficie de estos no suelen ser de acceso público en la mayoría de los casos. Para simular el comportamiento de un objetivo se ha optado por utilizar una patente de Olympus [18], para objetivos de 10x, 20x y 40x, los mismos con los que se cuenta en el laboratorio. Si bien las características de los objetivos descritos por las patentes no son las mismas de los que tiene el laboratorio, permitirán analizar de manera aproximada el comportamiento de estos. En la Fig. 4-18 se presenta un objetivo de 10X ubicado a la distancia de trabajo de la muestra. Para un objeto simulado de 0.6 mm de diámetro se genera una imagen magnificada de 6.15 mm, dando una magnificación de 10.258.

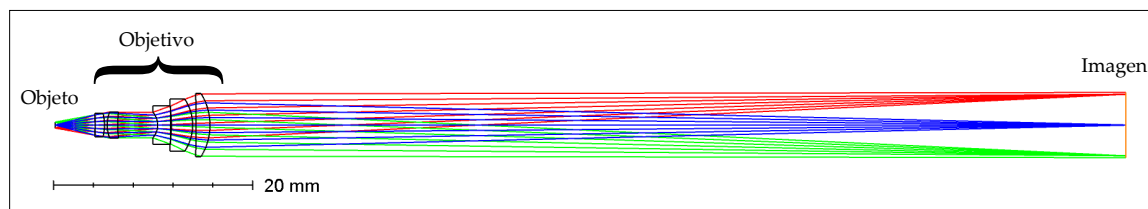


Figura 4-18: Trazado de rayos objetivo de 10X olympus para un objeto en la distancia de trabajo.

Los objetivos generalmente están corregidos para diferentes aberraciones por lo que estos suelen generar imágenes con una alta resolución y buen contraste. El elemento más crítico en el diseño de este sistema fue el doblete utilizado para llevar la imagen del plano imagen del objetivo a la cámara, como se mencionó en la sección 4.2.3, los dobletes generalmente presentan corrección cromática y un mejor desempeño cuando se utilizan con haces colimados, sin embargo, este no es el caso. Aun así, un doblete genera una imagen mucho menos aberrada que una lente simple convencional. Se emplea un doblete de 2" de diámetro y focal de 200 mm (Edmund Optics 45179). En la Fig. 4-19 se presenta el sistema 2f utilizado para llevar la imagen a la cámara desde el plano imagen del objetivo. Esta implementación tiene el propósito de permitir integrar ambos sistemas de iluminación, además de dar espacio para incluir un PSA, para lo cual se cuenta con el camino entre el doblete y la cámara.

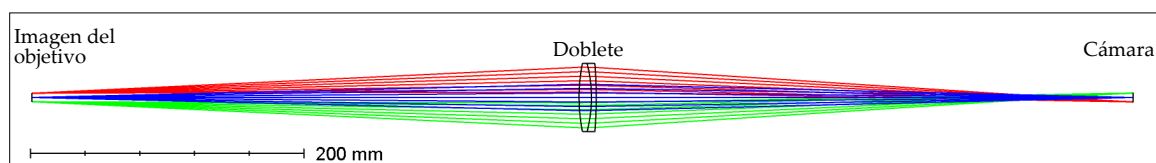


Figura 4-19: Trazado de rayos sistema 2f.

En la Fig. 4-20(a) se presenta una objeto, observado a través del sistema formador de imagen. La Fig. 4-20(b) corresponde a la imagen generada por el objetivo de microscopio en su plano imagen. La Fig. 4-20(c) corresponde a la imagen observada en la cámara luego de pasar a través del doblete. En contraste, se puede observar que la imagen intermedia formada por el objetivo presenta menos aberraciones que la imagen observada por la cámara, particularmente en la región marginal.

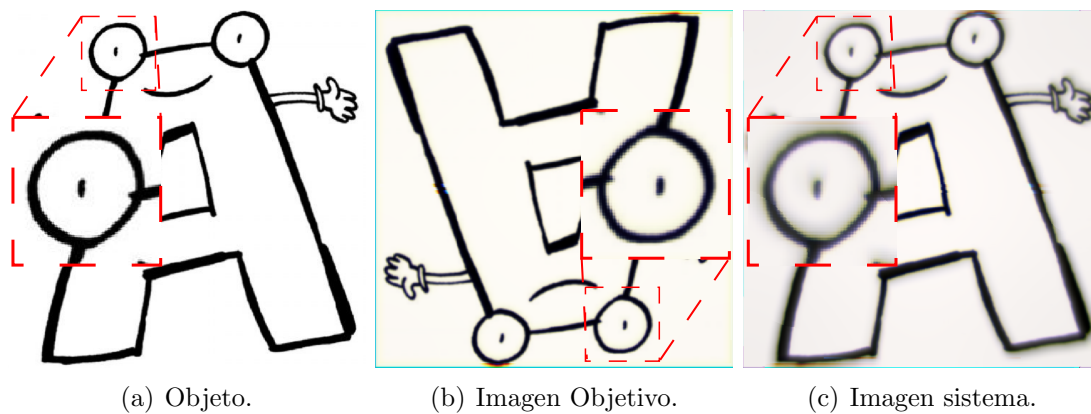


Figura 4-20: Simulación de una escena para el sistema formador de imagen del microscopio.

4.3.3. Análisis del sistema diseñado

Previo a la implementación de cualquier sistema óptico es importante tener un conocimiento acerca de cuáles serán las características y desempeño del dispositivo. OpticStudio permite analizar diferentes propiedades de los sistemas diseñados, entre las que se encuentran: aberraciones geométricas, resolución y contraste, efectos polarimétricos, entre otros. En varios de los análisis se evaluarán tres objetos puntuales ubicados en el eje óptico y otros dos a 0.3 mm en los ejes x y y , para modelar objetos cercanos al límite del campo de iluminación y observar los casos más extremos del sistema. Todos los análisis se realizarán teniendo en cuenta efectos polarimétricos, en las superficies del sistema.

Iluminación

El módulo secuencial de OpticStudio con el cual se han realizado el diseño del microscopio no cuenta con un módulo para el análisis de sistemas de iluminación. No obstante, basado en la definición del iluminador de Koehler se utiliza el diagrama de *spot* del sistema para determinar la homogeneidad de la iluminación. En la Fig. 4-21(a) se presenta el diagrama de *spot* de la fuente, la cual se ha modelado como cinco fuentes puntuales que contribuyen a la formación del plano de iluminación. En la Fig. 4-21(b) se observa cómo los rayos provenientes de cada fuente se superponen

y llenan homogéneamente la apertura, de acuerdo con el modelo del iluminador de Koehler. En la Fig. 4-21(c) se presenta la imagen de la fuente que crea el sistema antes del colector, en esta los *spots* de cada fuente son menos similares a una fuente puntual, esto debido a las aberraciones geométricas características de las lentes esféricas. La Fig. 4-21(d) corresponde al plano de iluminación obtenido, en donde se evidencia el efecto de las aberraciones del sistema. Aunque se obtiene un plano de iluminación con contribuciones de cada punto de la fuente, la iluminación difícilmente será completamente homogénea utilizando sistemas de lentes simples como los utilizados en el modelo.

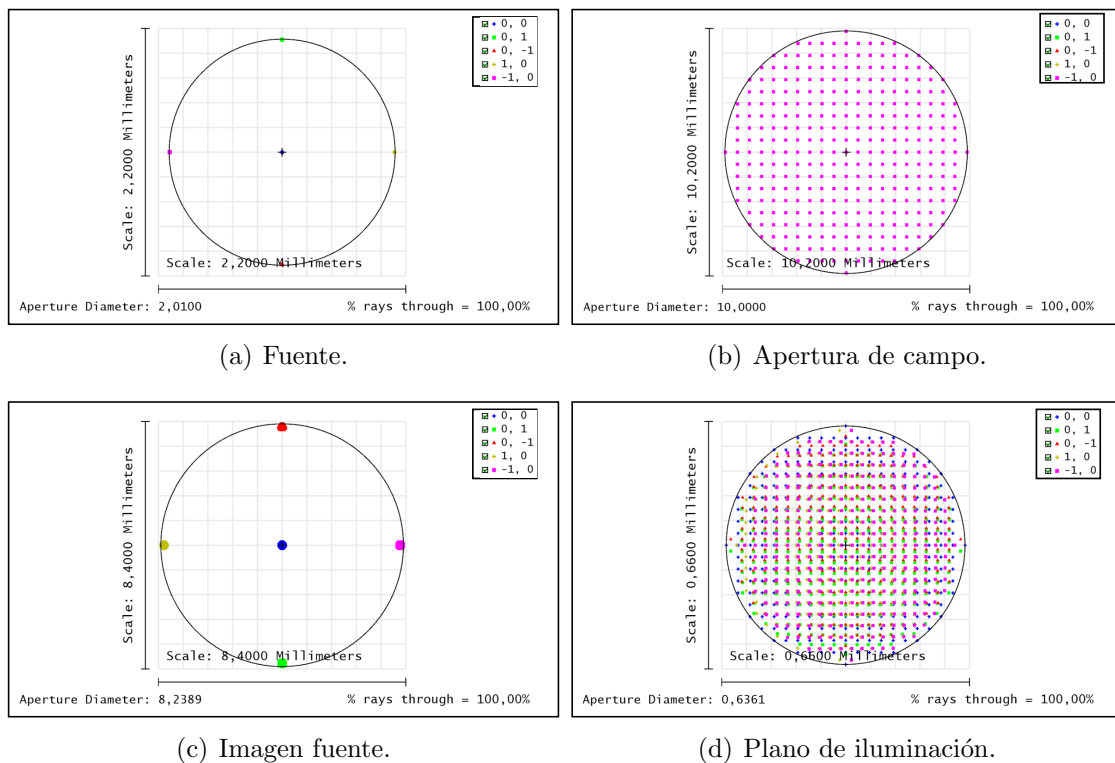


Figura 4-21: Diagrama de Spot para diferentes planos del sistema de iluminación a transmisión.

Función de transferencia de modulación

La Función de transferencia de modulación (*Modulation Transfer Function. MTF*) es el módulo de la función de transferencia óptica (*Optical Transfer Function. OTF*) y se puede definir como una función que relaciona el contraste de un sistema para

diferentes resoluciones. La MTF es un método de medida utilizado para comparar el desempeño de sistemas ópticos, se utiliza para evaluar desde sistemas sencillos como una lente simple hasta algunos más elaborados como telescopios y microscopios. En la Fig. 4-22 se puede observar la MTF del microscopio para tres puntos ubicados en el eje óptico y a 0.3 mm en los ejes x y y . La línea negra corresponde a la MTF del sistema limitado por difracción, la línea azul es la MTF para un punto ubicado en el eje óptico, en este caso ambas componentes tangencial y sagital se superponen. Las líneas roja y verde corresponden a la MTF de dos objetos a 0.3mm del eje óptico en x y y respectivamente. Se asume que la apertura numérica de la iluminación coincide con la del objetivo, por lo que la resolución del sistema debe ser máxima. La frecuencia de corte en la Fig. 4-22 es de 887 ciclos/mm, esto significa que el sistema puede observar hasta estructuras con un tamaño de $1.127 \mu\text{m}$. Este valor es inferior al valor teórico obtenido mediante el criterio de Rayleigh de $1.298 \mu\text{m}$, debido a que el primero no considera la capacidad de un sistema de adquisición (retina o cámara) para resolver dos puntos. En la región aumentada se puede observar cómo las componentes tangencial y sagital de los puntos fuera del eje óptico no se superponen, indicando astigmatismo en el sistema. Finalmente, se puede observar que la MTF del sistema se acerca al caso limitado por difracción, por lo cual el instrumento diseñado puede emplearse para observar estructuras con detalles muy finos, ideal para la formación de imagen.

Función de punto esparcido y error en el frente de onda

El criterio de Marechal [19] permite determinar la calidad de la imagen de un sistema óptico a partir del *Strehl ratio* de la función de punto esparcido de un sistema (PSF). El *Strehl ratio* corresponde a la magnitud máxima alcanzada por el pico central de la PSF del sistema y ésta tiene una relación directa con el error rms del frente de onda. El mínimo *Strehl ratio* requerido para que un instrumento óptico se considere limitado por difracción es de 0.8 (80%) o un error rms inferior a $\lambda/4$. En la Fig. 4-23 se presentan la PSF y mapa del frente de onda del sistema, en los que se puede observar que el *Strehl ratio* está en el orden de 0.95 (95%) y el error rms es de 0.0368

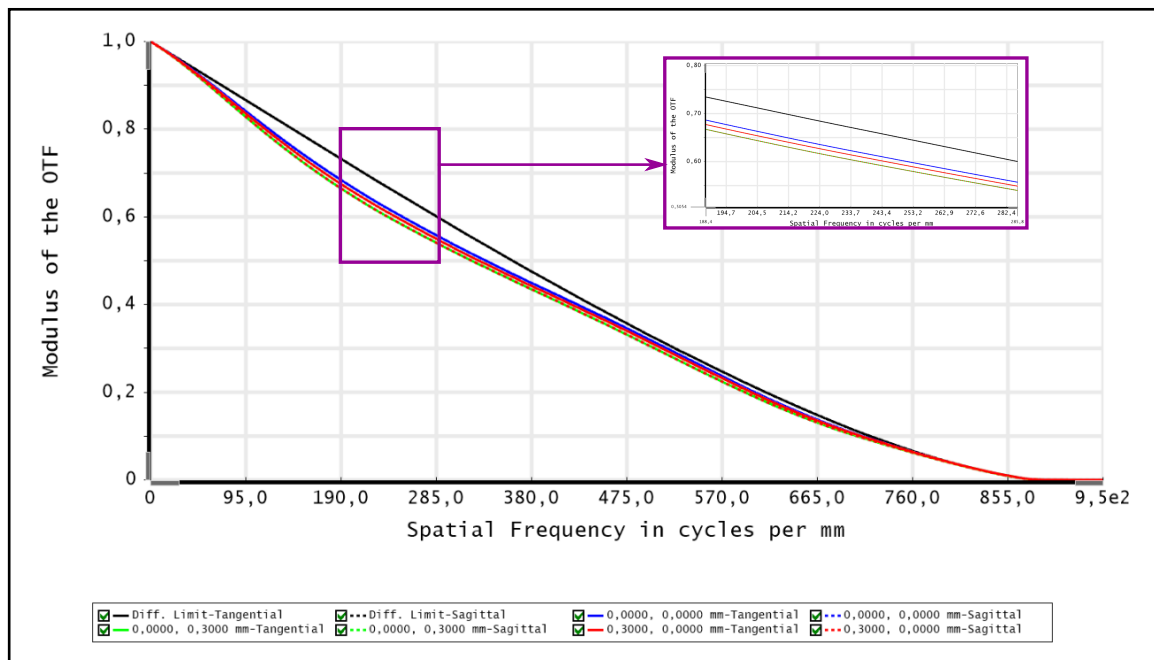
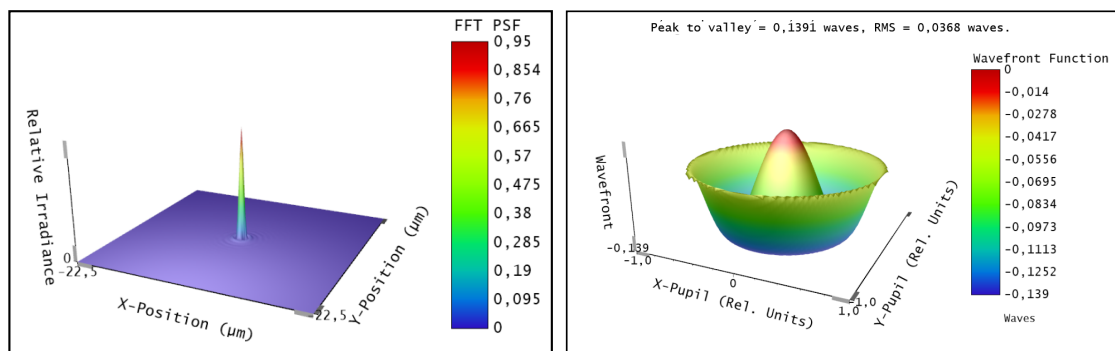


Figura 4-22: MTF del sistema formador de imagen del microscopio.

equivalente a aproximadamente $\lambda/8$. Esto indica que el sistema forma imágenes con un alto contraste dentro de sus límite de resolución.



(a) PSF del sistema.

(b) Mapa del frente de onda del sistema.

Figura 4-23: PSF y frente de onda del sistema para análisis de Marechal.

Aberraciones geométricas del sistema

Uno de los mayores problemas en cualquier sistema formador de imagen son las aberraciones cromáticas y geométricas. Dado que el microscopio a cuenta con iluminación monocromática centrada en 532 nm, longitud de onda en la que usualmente

son diseñados y calibrados los elementos ópticos, no se realizará ningún análisis sobre las aberraciones cromáticas del sistema. En cuanto a las aberraciones geométricas, éstas son características de todos los sistemas ópticos que emplean lentes esféricas. El uso de técnicas de óptica adaptativa o rigurosos métodos de diseño permiten corregir estas aberraciones, sin embargo, dichas técnicas no son abordadas en este trabajo, en su lugar se busca que estas tengan el menor impacto posible sobre el sistema. Con el análisis realizado sobre la MTF y el criterio de Marechal se puede afirmar que aunque el sistema presenta aberraciones, estas no deben de ser muy grandes ni influir de manera importante sobre el desempeño del sistema. OpticStudio provee muchas herramientas para el análisis de aberraciones en el sistema como lo son los diagramas de *spot*, curvas de aberración denominadas *ray fan*, rejillas de distorsión, gráficas de curvatura de campo, entre otras. Abordar todas estas técnicas podría volverse una tarea sumamente extensa que no proveerá información adicional, en su lugar se presenta la tabla 4.1 con los conocidos polinomios de Zernike para un objeto en el eje óptico y otros dos desplazados 0.3 mm en los ejes x y y . Se toman únicamente los primeros 15 polinomios de Zernike, en los cuales generalmente se encuentran las aberraciones más apreciables.

Ninguna aberración presenta un peso por encima de 0.0578λ , lo cual en términos cualitativos es bueno para un sistema formador de imagen. El desenfoque del sistema se puede asociar a que no se utiliza el punto en el que se encuentra el mejor punto de enfoque para un objeto en el eje óptico, sino un compromiso para obtener la mejor imagen del sistema. Los tilt en x y y de los objetos en los extremos del campo de iluminación indican que la imagen podría presentar bajo contraste en los extremos de la imagen. Por último, las aberraciones esféricas, astigmatismo y coma indican que las imágenes generadas por el microscopio irán perdiendo contraste a medida que sus puntos se alejan del eje óptico.

Es necesario mencionar que el desempeño del microscopio una vez construido no necesariamente corresponderá al del modelo diseñado. Los valores presentados en la tabla 4.1 corresponden a un sistema con una alineación perfecta, condición que difícilmente se puede lograr con el equipo al que se tiene acceso. Así pues, las

Tabla 4.1: Pesos de Zernike (notación de Noll) del sistema de microscopia diseñado

| Z_j | Nombre | Peso(0,0) [λ] | Peso(0.3,0) [λ] | Peso(0,0.3) [λ] |
|----------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Z_1 | Piston | -0.1003 | -0.0893 | -0.0893 |
| Z_2 | x tilt | 0 | -0.0578 | 0 |
| Z_3 | y tilt | 0 | 0 | -0.0578 |
| Z_4 | defocus | 0.0078 | 0.0136 | 0.0136 |
| Z_5 | y primary astigmatism | 0 | 0 | 0 |
| Z_6 | x primary astigmatism | 0 | 0.004 | 0.004 |
| Z_7 | y primary coma | 0 | 0 | -0.029 |
| Z_8 | x primary coma | 0 | -0.029 | 0 |
| Z_9 | y trefoil | 0 | 0 | 0 |
| Z_{10} | x trefoil | 0 | 0 | 0 |
| Z_{11} | primary spherical | 0.028 | 0.0274 | 0.0274 |
| Z_{12} | x secondary astigmatism | 0 | -0.0003 | -0.0003 |
| Z_{13} | y secondary astigmatism | 0 | 0 | 0 |
| Z_{14} | x tetrafoil | 0 | 0 | 0 |
| Z_{15} | y tetrafoil | 0 | 0 | 0 |

aberraciones del microscopio serán mayores que las del modelo simulado.

Análisis polarimétrico

Uno de los aspectos más importantes que deben abordarse al momento de realizar medidas polarimétricas con sistemas formadores de imagen, son los efectos polarimétricos que introduce el sistema. Cuando se desarrolla un instrumento de imagen polarimétrica se procura que este no genere cambios sobre la polarización de la luz, y en caso de que se presenten, es necesario conocerlos para tomarlos dentro de consideración en las medidas que se realicen. En la Fig. 4-24 se presenta un mapa de polarización de la pupila del microscopio a transmisión. A simple vista no se puede observar ninguna diferencia entre el estado de polarización de los rayos en la pupila de salida con respecto a la de entrada, sin embargo, analizando una lista de parámetros por rayo proporcionada por OpticStudio se puede obtener la *polarization optical transfer function* (POTF) [13].

La POTF da información de las propiedades polarimétricas del sistema modelado

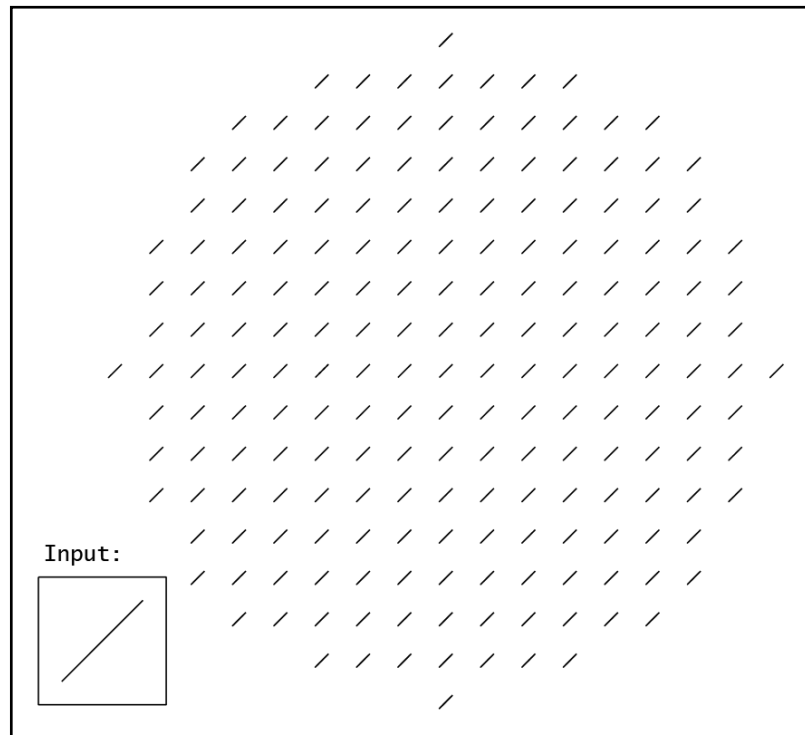


Figura 4-24: Mapa de polarización microscopio a transmisión.

como una pupila. En la Fig. 4-25 se presentan la diatenuación, retardo de fase y ángulo de rotación sobre la luz introducidos por el sistema. Mediante estos datos es posible construir las matrices de Jones y Mueller del instrumento, y con estas corregir las medidas obtenidas. En la imagen 4-25(a) se presenta el desfase en radianes introducido por el instrumento, el cual para un cambio de 0,04 radianes corresponde a un desfase aproximado de $1/157 \lambda$. Los cambios presentados en la Fig. 4-25(b) están en el orden de 10^{-3} , lo cual puede interpretarse como una diatenuación del 0,1 %. Finalmente, los cambios en el ángulo de rotación de la polarización están por debajo de la resolución del sistema de rotación que se utiliza en los PSG y PSA del sistema. La simulación indica que el instrumento presenta efectos polarimétricos no deseados, pese a ello, estos son lo suficientemente pequeños para ser despreciados.

En la Fig. 4-26 se presenta el mapa de efectos polarimétricos del microscopio a reflexión. En este caso puede observarse que existe un cambio aún mayor sobre la polarización de la luz, aun así, este sigue siendo difícil de apreciar a simple vista. En la región aumentada de la figura se ve como empieza a notarse elipticidad en la

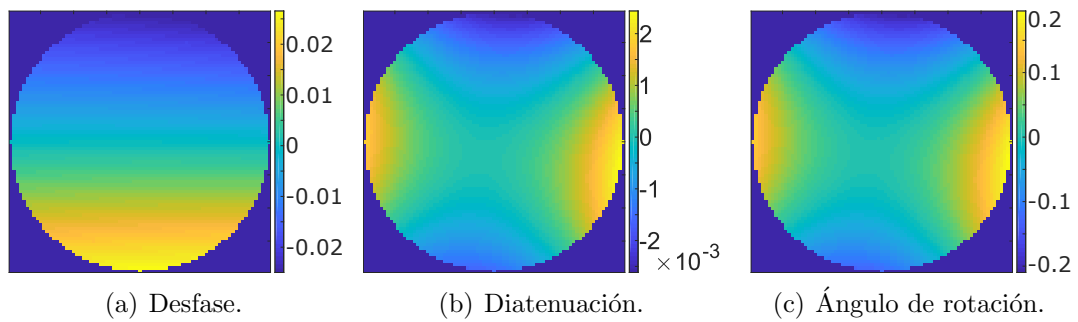


Figura 4-25: POTF del microscopio a transmisión.

polarización de algunos rayos.

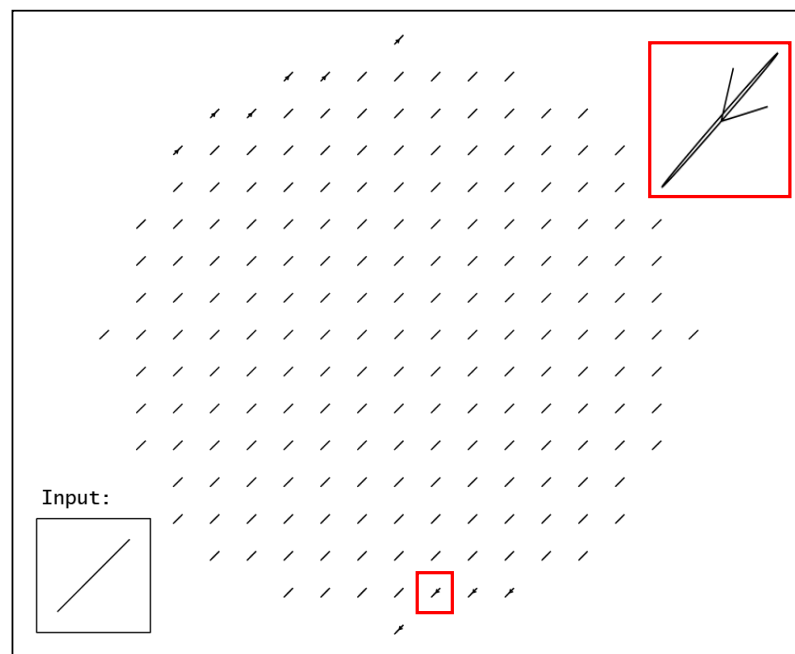


Figura 4-26: Mapa de polarización microscopio a reflexión.

En la Fig. 4-27 se presenta la PTOF del microscopio a reflexión. En los diferentes parámetros puede observarse cómo todos los valores incrementan, el desfase del sistema a reflexión es aproximadamente el doble que a transmisión, la diatenuación está un orden de magnitud por encima y la rotación en la polarización de la luz empieza a estar por encima de la resolución del sistema de rotación. Por esta razón, es importante calibrar experimentalmente la PTOF del microscopio y determinar su efecto sobre las medidas.

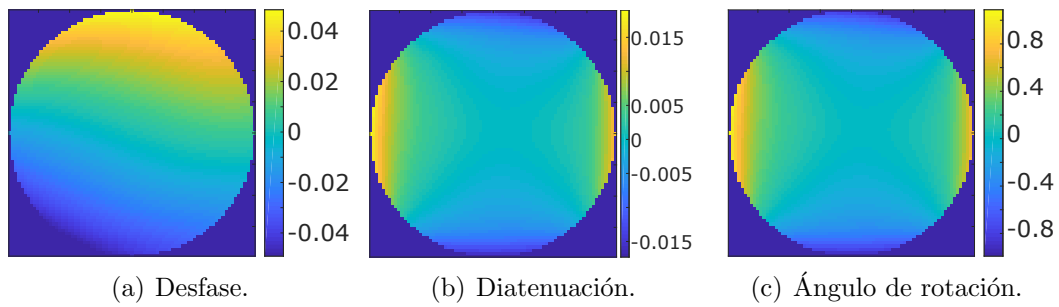


Figura 4-27: POTF del microscopio a reflexión.

4.4. Implementación

En la Fig. 4-28 se presenta un esquema del diseño final implementado. El sistema está conformado por una estructura principal que permite el montaje de los objetivos de microscopio en orientación vertical, además posee dos espejos que permiten recibir y enviar la luz en dirección horizontal. Al lado de esta estructura se encuentra una plataforma para el montaje y desplazamiento de la muestra, esta cuenta con una resolución en z de un micrómetro dado por el tornillo micrométrico (Newport SM-13) utilizado para enfocar. Una mesa permite desplazar la muestra en el plano $x - y$, aunque no cuenta con un nonio para desplazamientos controlados. Los diferentes elementos utilizados en los sistemas de iluminación se ubican sobre postes, de manera que el eje óptico del sistema se encuentre a 15.5 cm sobre el plano de la mesa óptica en la que se realiza el montaje. Las lentes se ubican en tubos para montura, los cuales a su vez son montados en portatubos; estos permiten desplazar las lentes en dirección del eje óptico, para así, ajustar distancias sin introducir mayores desviaciones en la luz. El condensador de la iluminación a transmisión debe ser ubicado con su eje óptico en dirección vertical.

Para todo el sistema se emplean dos fuentes de iluminación: una fuente led (THORLABS MCWHP1) se utiliza para la iluminación a transmisión. Esta es filtrada mediante un filtro interferométrico en 532nm (THORLABS FL532-3). A reflexión se utiliza un diodo láser de 532nm (THORLABS DJ532-40) y se emplea un arreglo de dos difusores para descorrelacionar el campo, haciendo que uno de estos rote. Un cubo divisor no polarizado de 50-50 (THORLABS BS032) se utiliza para combinar

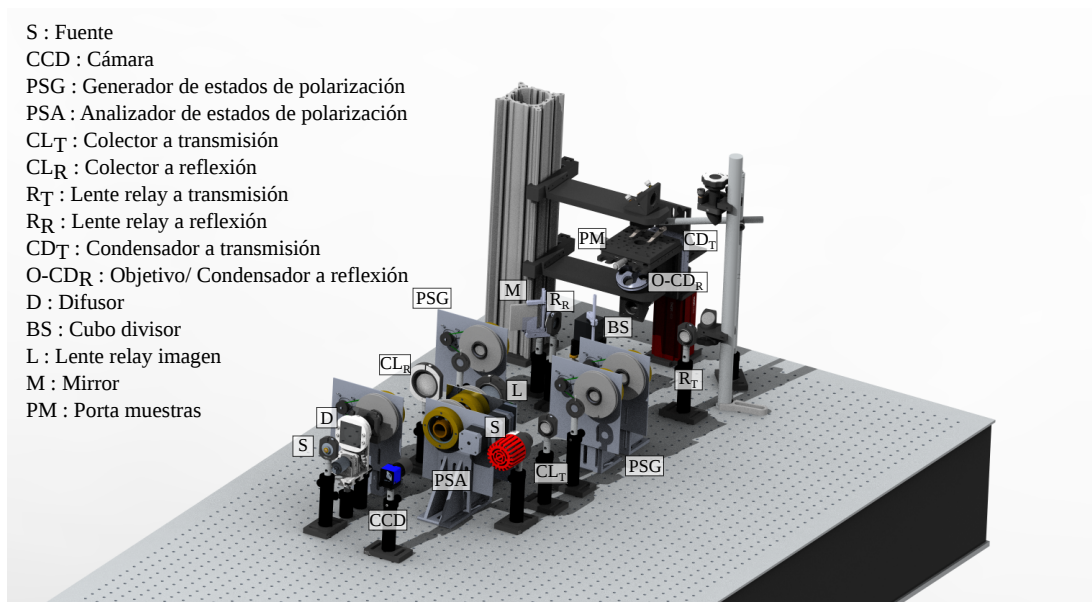


Figura 4-28: Vista isométrica del montaje final.

los caminos de la iluminación a reflexión y el sistema de formación de imagen. En la Fig. 4-29 se puede observar que uno de los caminos del cubo divisor no es empleado, éste presenta un campo de iluminación que puede ser utilizado para iluminar muestras que se deseen observar a reflexión sin magnificación, ya que dicho plano coincide con el plano objeto del doblete. Este segundo campo de iluminación puede ser utilizado para el futuro desarrollo de un microscopio de coherencia óptica con polarización.

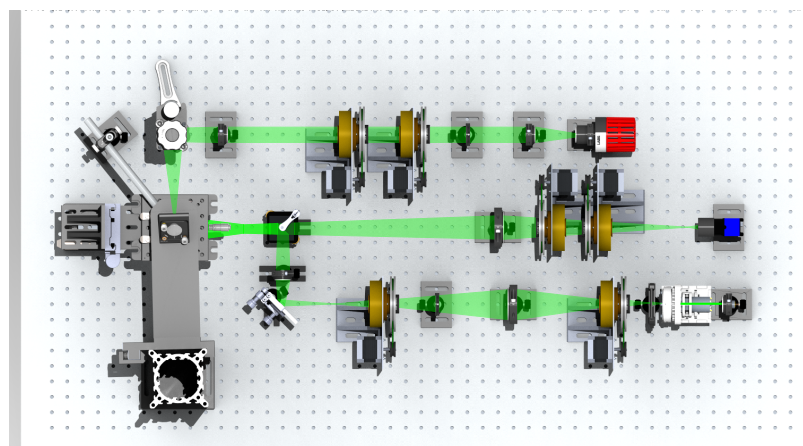


Figura 4-29: Esquema vista superior del montaje final.

El sistema de formación de imagen está compuesto por el objetivo de microscopio, un doblete y una cámara CCD. En caso de utilizar un objetivo con una distancia

de tubo diferente, es posible desplazar la cámara y observar la muestra, aunque esta presentará una magnificación adicional dada por el doblote, el cual ya no formará un sistema 2f.

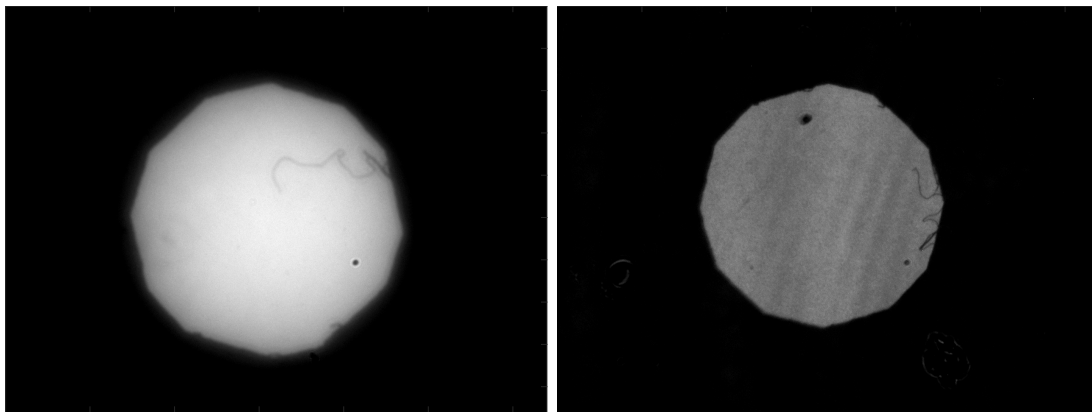
4.5. Análisis del instrumento

Como se mencionó al principio de este capítulo existen tres parámetros fundamentales al momento de evaluar un sistema formador de imagen, estos son la magnificación, resolución y contraste. En esta sección se estudiarán éstos parámetros, mediante el análisis de diferentes imágenes obtenidas a través del microscopio. Adicionalmente, se determinará si el sistema presenta efectos polarimétricos apreciables que deban ser tomados dentro de consideración, o acorde con la simulación realizada a través de OpticStudio estos son despreciables.

4.5.1. Iluminación

El propósito de implementar un sistema de iluminación de Koehler es asegurar un campo de iluminación homogéneo sobre la muestra tanto a transmisión como a reflexión. En ambos casos se implementaron sistemas de iluminación mediante lente de *relay*, en los que debido a la disponibilidad de equipo y requerimientos del sistema se utilizaron sistemas de colección en los que se desperdicia un porcentaje de la potencia total de la fuente. No obstante, el aspecto fundamental es que la cantidad de luz que llega a la muestra sea la suficiente para generar un buen contraste sobre ésta. En la Fig. 4-30 se presenta las imágenes de la apertura de campo para el microscopio a transmisión y reflexión, en donde se puede observar el campo de iluminación sobre el portamuestra para el caso a transmisión y con un espejo de segunda superficie para el caso a reflexión. En la imagen a reflexión se tiene un patrón de interferencia por película delgada, dada por las dos superficies del espejo.

En la Fig. 4-31 se puede observar los histogramas de la iluminación, en los que se aplica una máscara sobre las figuras en 4-30 y se toman únicamente los datos dentro de la región de iluminación. En ambos histogramas se puede observar una distribu-

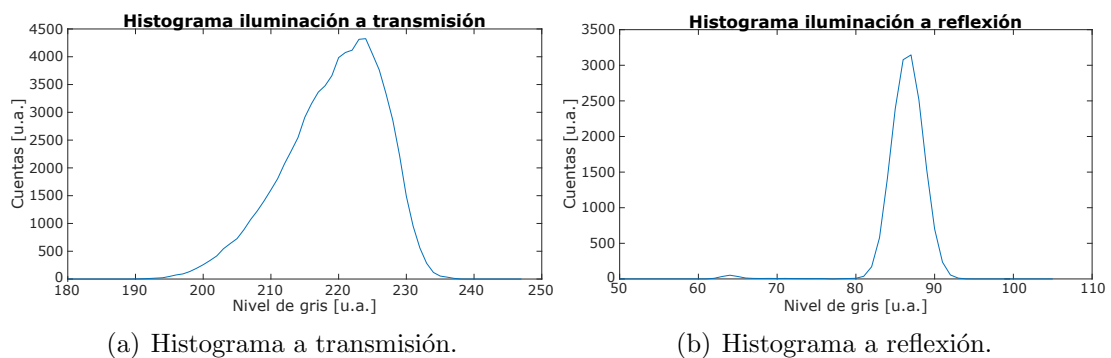


(a) Iluminación a transmisión.

(b) Iluminación a reflexión.

Figura 4-30: Campos de iluminación del microscopio a transmisión y reflexión.

ción Gaussiana, indicativo de que la intensidad decae progresivamente a medida que se aleja del centro de la iluminación; en parte debido a la luz cortada por la apertura finita del objetivo y de la apertura de campo, además de la aberración esférica característica de las lentes utilizadas [20]. La desviación estándar para la iluminación a reflexión es de 2.9 y 7.2 a transmisión, lo que significa que la iluminación a reflexión decae radialmente más lento que a transmisión, efecto asociado a la diferencia en las fuentes de luz.



(a) Histograma a transmisión.

(b) Histograma a reflexión.

Figura 4-31: Histograma de los campos de iluminación del microscopio a transmisión y reflexión.

4.5.2. Magnificación

Una filmina para calibración de Carl Zeiss es utilizada para medir la magnificación del microscopio. Ésta filmina presenta una regla con escala que se puede utilizar para determinar el tamaño real de una imagen. La magnificación total del sistema es el producto entre la magnificación del objetivo de microscopio y el efecto introducido por el doblete que se tiene en el sistema formador de imagen. En principio, la magnificación del sistema debería ser la misma del objetivo, sin embargo, como se presentó en la simulación en OpticStudio, ubicar perfectamente los elementos puede resultar en una tarea ardua y altamente instrumentada, así que pequeños errores en la magnificación se pueden dar en el sistema. Los errores se deben tanto a problemas en la ubicación del doblete como en la posición del plano imagen del objetivo. En la Fig. 4-32 se presentan las imágenes de la regla de calibración de Carl Zeiss tomadas por el sistema en modo a transmisión y reflexión con un objetivo de 10X. Entre líneas se tiene una distancia de 0.1 mm, medida que se utiliza como referencia para determinar la magnificación del sistema.

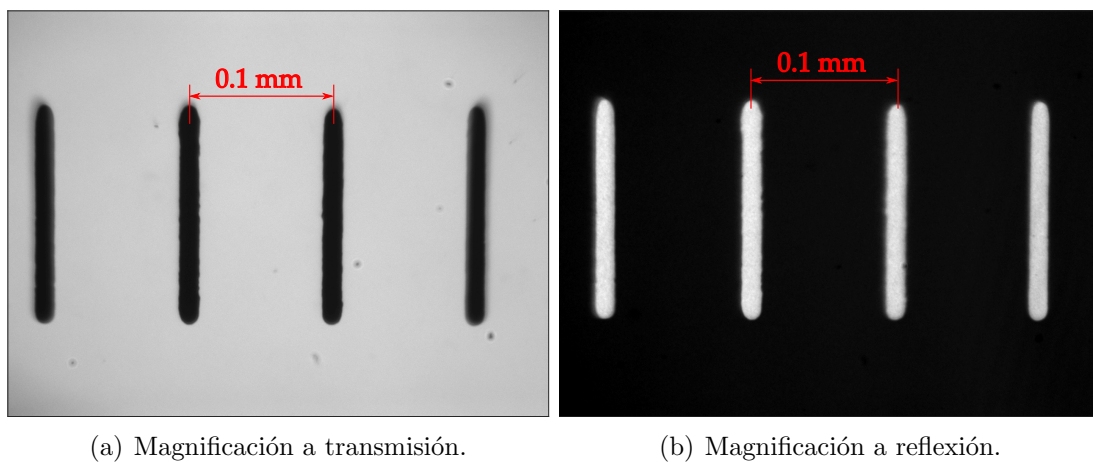


Figura 4-32: Magnificación del microscopio con una regla de calibración Carl Zeiss.

En el microscopio se utiliza una cámara CCD de dimensiones 960×1280 píxeles, con un tamaño de pixel de $3,75\mu\text{m} \times 3,75\mu\text{m}$. La Fig. 4-33, muestra los perfiles de las imágenes de la regla calibración. La distancia medida entre dos, tres, y cuatro líneas se emplea para determinar la magnificación del microscopio con un objetivo de

10X. Se determina el número de píxeles entre dos transiciones y se multiplica por el tamaño de píxel de la cámara, el producto será el tamaño real de la imagen. La razón entre la dimensión de la imagen obtenida y la resolución de la regla proporcionada por el fabricante, será la magnificación total del sistema para un objetivo de 10X.

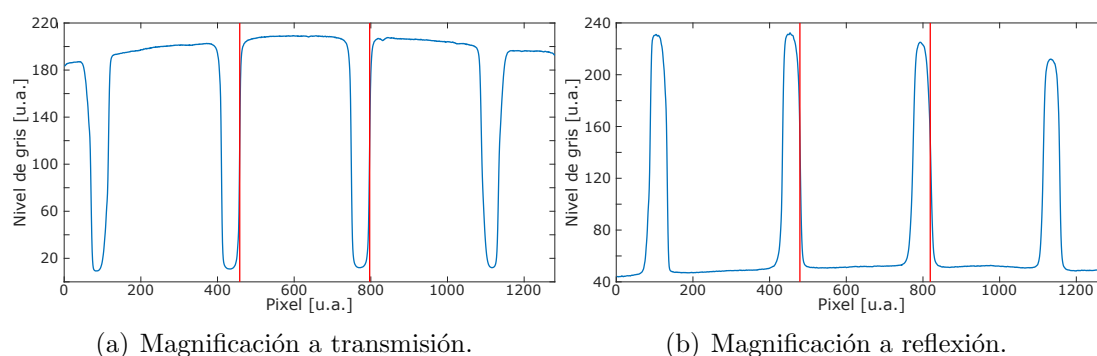


Figura 4-33: Perfil de intensidad utilizado para el cálculo de la magnificación.

Para diferenciar la magnificación debida al doblote de la introducida por el objetivo se tomó una imagen de regla de calibración en el plano imagen de un objetivo de 10X. La razón entre la magnificación en la cámara y el plano imagen del objetivo, es la magnificación introducida por el doblote. Esta magnificación adicional es de 1.06 aumentos. En la tabla 4.2 se presentan las magnificaciones propias de cada objetivo.

Tabla 4.2: Magnificación experimental de los objetivos del laboratorio

| Objetivo | Magnificación |
|-------------|---------------|
| 10X Newport | 12.07 |
| 20X Newport | 24.21 |
| 40X Newport | 46.73 |
| 20X Olympus | 20.04 |

Las diferencias entre las magnificaciones obtenidas y las reportadas por el fabricante se dan por la distancia de tubo utilizada para el montaje. En los objetivos de Newport que tienen una distancia de tubo de 160mm se está tomando la imagen 20mm más adelante, lo que reduce la distancia de trabajo del microscopio y aumenta su magnificación.

4.5.3. Contraste y resolución

Estos son los factores más relevantes del sistema cuando se desea analizar el desempeño de un microscopio. La resolución teórica de los sistemas puede ser calculada mediante la Eq. 4.1. Esta resolución corresponde a un sistema limitado por difracción, desafortunadamente, se sabe que el sistema presentará aberraciones geométricas que reducirán su resolución máxima. Mediante la medición del modulo de la OTF del sistema se puede determinar la resolución experimental máxima como la frecuencia de corte de la misma.

Medición de la MTF

Existen diferentes métodos para determinar experimentalmente la MTF de un sistema. Uno de los métodos consiste en medir la función respuesta al impulso del sistema. La PSF es la imagen del sistema para un objeto puntual y su transformada de Fourier es la OTF, una función compleja cuya magnitud (valor absoluto) corresponde a la MTF [21]. Un método relativamente sencillo para medir la MTF es tomar la imagen de un objeto puntual y calcular el valor absoluto de su transformada de Fourier. El problema es determinar cuando un objeto puede ser considerado una fuente puntual para el sistema.

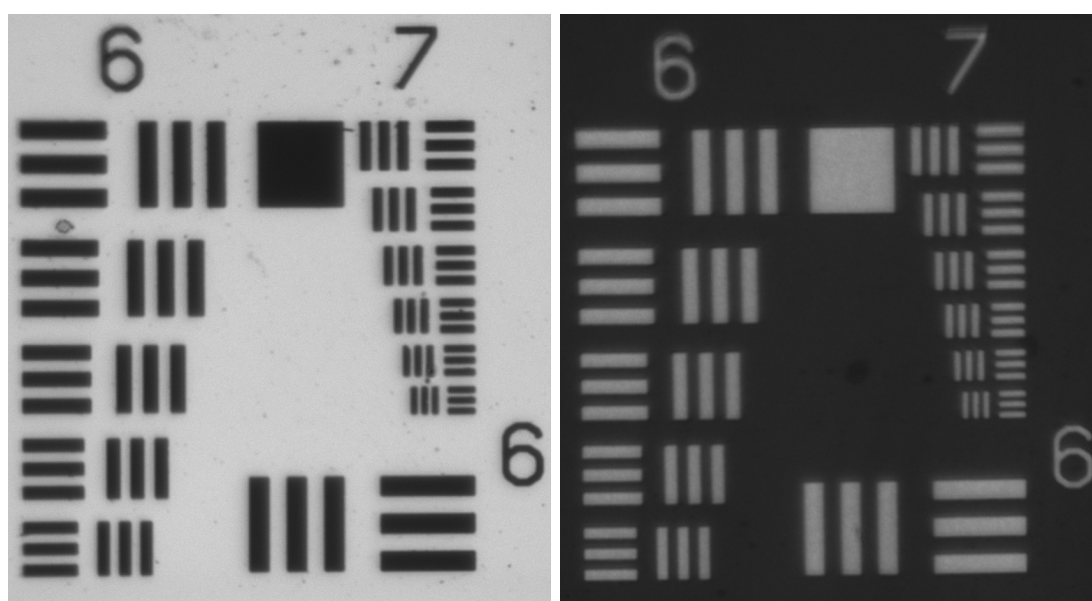
Otro método consiste en utilizar muestras para la medición de resolución, las cuales se pueden adquirir en diferentes proveedores de elementos ópticos. Algunos de los más comunes son el USAF 1951 y el *star target*. Lo que se hace es medir el contraste para las diferentes resoluciones con las que cuenta la muestra a través de la Eq. 4.1. El problema con este método es la máxima resolución que se puede medir; por ejemplo, el USAF 1951 puede medir una resolución máxima de 228 ciclos/mm, muy por debajo de la resolución máxima de un sistema de microscopía en donde la resolución suele ser del orden de 400 ciclos/mm.

Otro método similar a la medición de la PSF es presentado por Samei y Flynn [22], para la medición de la MTF en sistemas de radiografía. A diferencia del método de la PSF, este propone medir un escalón recto entre dos regiones con diferente reflectancia

o transmitancia y de esta manera obtener la *Edge Spread Function* (ESP). La derivada de una función escalón es una función delta de Dirac, dando lugar a una función de línea esparcida (LSF), la cual puede entenderse como una sucesión de muchas PSFs. De esta manera, la magnitud de la transformada de Fourier de la LSF será la MTF en la dirección perpendicular al escalón.

Medición de la MTF del sistema

Para calcular la MTF del sistema se ha utilizado los tres métodos ya descritos. En la Fig. 4-34 se presenta la imagen de un USAF 1951 para un objetivo de 10X a transmisión y reflexión, como se puede observar ambos pueden resolver las frecuencias más altas. Sin embargo, esto no permite determinar la resolución máxima del sistema pero podemos afirmar que la resolución del microscopio es superior a 228 ciclos/mm.



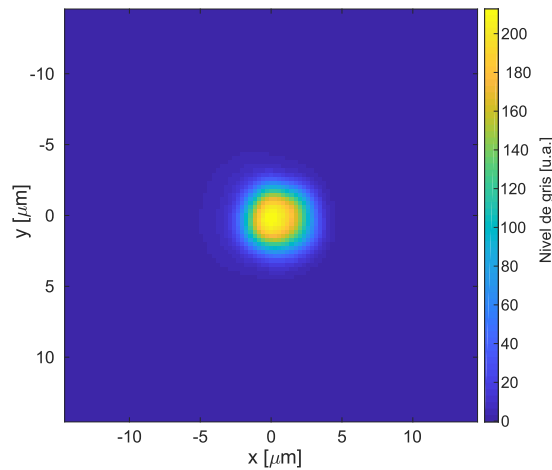
(a) USAF a transmisión.

(b) USAF a reflexión.

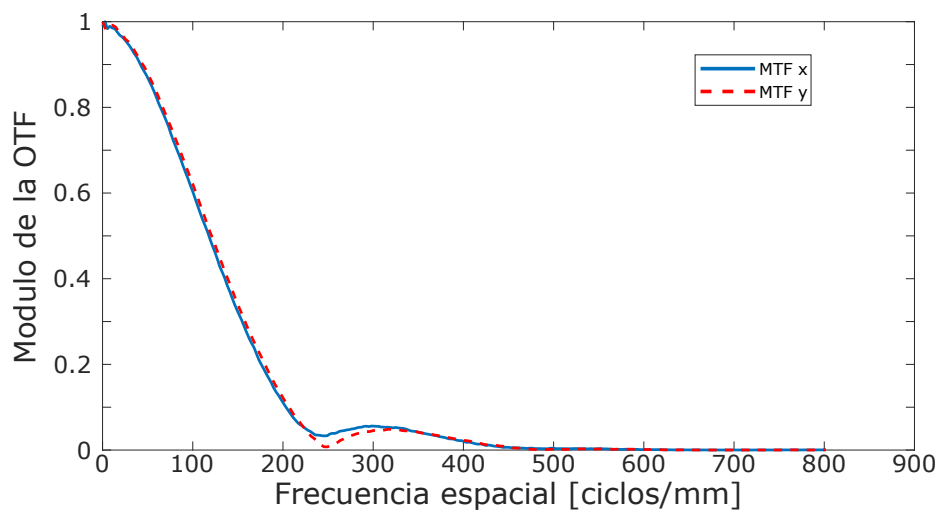
Figura 4-34: Imagen de un USAF para frecuencias de 64 a 228 ciclos/mm.

Para medir la MTF mediante la PSF se utiliza *pinhole* de $5\mu\text{m}$, lo cual se considera un objeto puntual si tomamos como referencia que la resolución máxima del sistema bajo el criterio de Rayleigh es de $1,298\mu\text{m}$. En la Fig. 4-35 se presenta la imagen del *pinhole* y la correspondiente MTF para un objetivo de 10X. En comparación

con la MTF teórica calculada con OpticStudio, la MTF experimental del microscopio presenta un desempeño significativamente inferior. Determinar las aberraciones geométricas del instrumento mediante la MTF no es posible, pero se puede observar que el microscopio presenta astigmatismo, ya que hay una caída del contraste más rápida en y que para x . Con base en el análisis de aberraciones realizado en OpticStudio, la MTF ha empeorado debido a efectos de coma y aberración esférica, los cuales deben de haber incrementado debido a problemas en la alineación [23]. A partir de la MTF se tiene que la resolución máxima del sistema es de aproximadamente 400 ciclos/mm, permitiendo observar objetos de $2\mu\text{m}$.



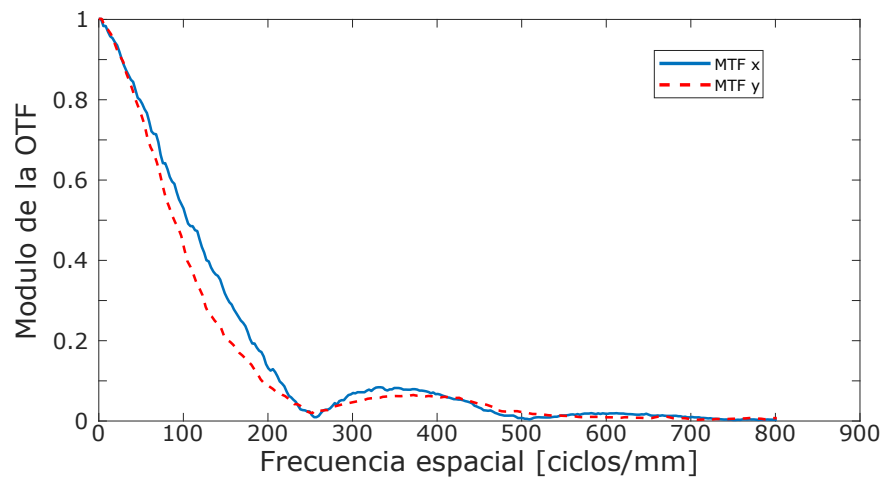
(a) PSF para un pin hole de $5\ \mu\text{m}$.



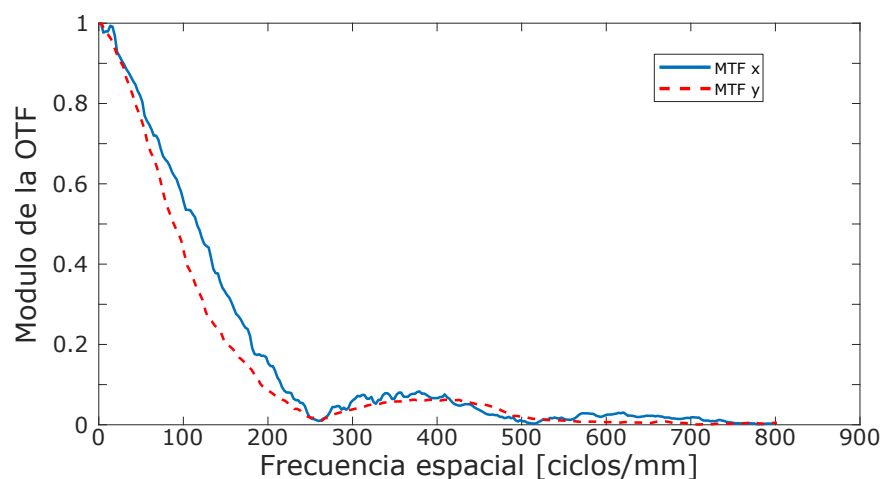
(b) MTF.

Figura 4-35: MTF a transmisión calculada mediante PSF.

Debido a que no se conoce el tamaño para que un objeto sea considerado puntual, es mejor emplear la ESP del sistema ya que esta usa una función escalón que es reconocible por el sistema formador de imagen. En la Fig. 4-36 se presenta las MTF a transmisión y reflexión del microscopio obtenidas mediante el método propuesto por Samei y Flynn. Debido a que el cálculo de la MTF a partir de la ESP requiere aproximaciones numéricas, los resultados obtenidos presentan rizados que en los modelos ideales no se presentan, sin embargo, debido a la naturaleza del experimento, es normal la presencia de este tipo de artefactos [22]. La MTF obtenida mediante este método es bastante parecida a la calculada a través de la PSF a transmisión, con la diferencia de que en esta hay una rápida caída cerca de 270 ciclos/mm.



(a) MTF microscopio a transmisión.



(b) MTF microscopio a reflexión.

Figura 4-36: MTF calculada mediante un Step.

4.5.4. POTF del sistema

Para determinar la POTF del microscopio se realiza una medida de las propiedades polarimétricas en un plano de observación sin estructuras complejas. En el caso a transmisión se enfocó un portamuestras, mientras que a reflexión se utilizó el recubrimiento de un espejo de segunda superficie. Los parámetros calculados corresponden a la contribución de todos los elementos por los que viaja la luz, exceptuando las lentes colectoras, que están en el camino óptico del PSG y PSA.

En la Fig. 4-37 se presenta la POTF para el microscopio a transmisión, asumiendo que no hay efectos polarimétricos en el portamuestras. La diatenuación presenta un cambio de aproximadamente 4%, un efecto mayor al obtenido en la simulación realizada con OpticStudio. La Fig. 4-37(a) tiene la forma de un plano inclinado en $x - y$, por lo cual se puede implementar una rutina para retirar los efectos causados por instrumento y obtener el efecto neto de la muestra cuando se considere necesario. La retardancia del instrumento está en el mismo orden de magnitud que la obtenida mediante OpticStudio, unos 0,04 radianes, por lo que su efecto puede ser despreciable. Adicionalmente, considerando que la diatenuación y desfase no son apreciables, la rotación del sistema coordenado no tiene mucho impacto. A pesar de que idealmente un sistema óptico no debe presentar efectos de despolarización, medirla es necesario cuando se planea realizar mediciones en muestras biológicas. En la Fig. 4-37(d) se puede observar que la despolarización del instrumento está en el mismo rango que su diatenuación. A menos que se necesite realizar comparaciones de alta precisión basadas en la despolarización de los medios, una magnitud del 2% es tolerable para medidas convencionales.

En la Fig. 4-38 se presenta la POTF del microscopio a reflexión. A diferencia del análisis a transmisión, en este caso debemos considerar que para hacer imagen fue necesario ubicar un elemento reflectivo en el plano de enfoque del microscopio, para lo que se usó un espejo, cuyos efectos deben ser tomados dentro de consideración. En la Fig. 4-38(a) se puede observar la diatenuación de la pupila del instrumento, en donde se encuentran un par de puntos de color rojo y azul, probablemente asociados

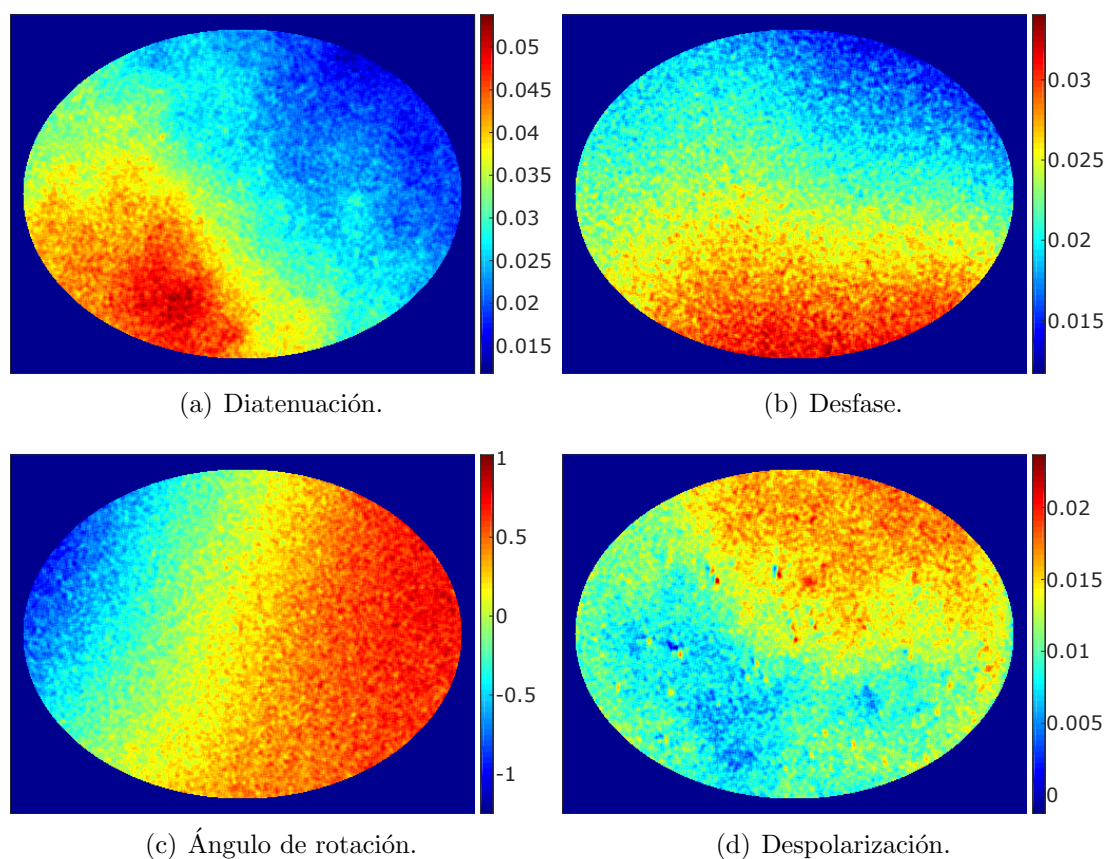


Figura 4-37: POTF del microscopio a transmisión.

a una concentración irregular de material en el recubrimiento del espejo. El valor promedio de la diatenuación es de 0,1, lo cual daría un cambio del 2%; este valor no genera problemas para observar cualitativa o cuantitativamente una imagen con un cambio en su diatenuación del 8%, como es el caso de los dos puntos presentes en la Fig. 4-38(a). La Fig. 4-38(b) presenta un desfase promedio de 1,275 radianes, este debería considerarse en las mediciones; sin embargo, en este caso debemos recordar que se está haciendo imagen de un espejo, que introduce por si mismo este desfase y no el instrumento. El cambio que se da en el desfase es de aproximadamente 0,04 radianes, donde dependiendo de la sensibilidad de la medida pueden ser tomados dentro de consideración y abstraídos de la imagen. Nuevamente podemos observar que a reflexión la despolarización del sistema tampoco es representativa.

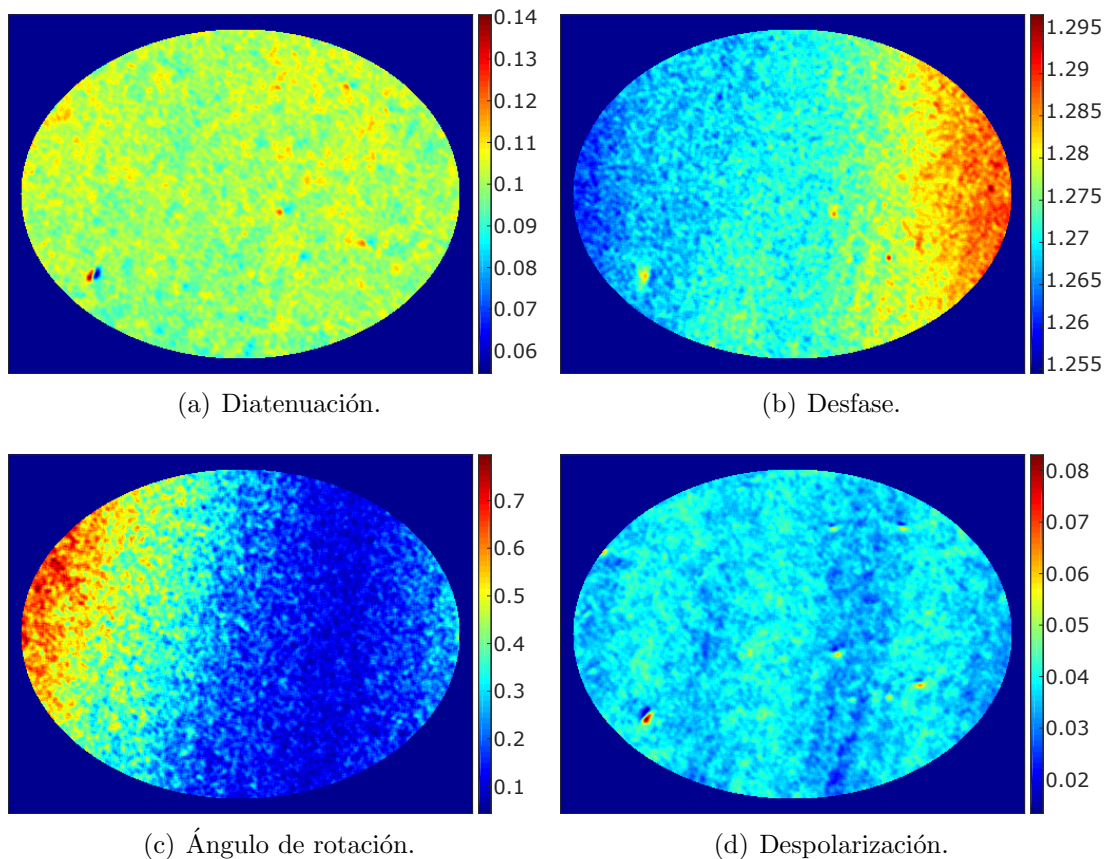


Figura 4-38: POTF del microscopio a reflexión.

4.6. Propiedades polarimétricas en muestras biológicas

Antes de mostrar los resultados asociados a la medición de muestras biológicas con el microscopio desarrollado, se presenta una corta introducción con respecto a las propiedades ópticas de los medios biológicos.

La primera consideración que debe tomarse en cuenta al evaluar el comportamiento de la luz en muestras biológicas es que éstas son medios turbios [24, 25]. Como tales presentan no uniformidad en sus propiedades ópticas, acotados como cambios en el índice de refracción. Estos cambios pueden ser lo suficientemente pequeños para no generar efectos importantes sobre las propiedades de la luz. En otros casos, las irregularidades en el medio son significativas y dan paso al fenómeno de esparcimiento a través de la muestra. El esparcimiento se da a transmisión o reflexión y

genera un cambio aleatorio en la dirección de propagación de la luz. De esta manera, la interacción de la luz con los tejidos biológicos se clasifica en efectos de reflexión, esparcimiento y absorción [7].

Cuando la luz incide sobre un tejido, un porcentaje de esta se refleja o es esparcida por la superficie de la muestra, conservando sus propiedades polarimétricas. Con incidencia normal, alrededor del 4-7 % de la luz incidente en todas las longitudes de onda es reflejada en la superficie del tejido, debido al gran cambio en el índice de refracción de la muestra con respecto al aire [7]. La reflexión que se da sin efectos de esparcimiento se conoce como reflexión especular, y no introduce cambios sobre el estado de polarización de la luz. Incluso un par de eventos de esparcimiento cercanos a la superficie del tejido no generan un efecto apreciable sobre el estado de polarización [24, 26]. La retro-reflexión especular que se da en la primera superficie de la muestra es la que da mayor información de la textura o relieve de la muestra cuando se realizan medidas a reflexión [7].

La luz que logra pasar la primera superficie de la muestra, penetra el tejido y avanza por el medio a través diversos eventos de esparcimiento. La luz es esparcida aleatoriamente a lo largo del tejido, mientras es absorbida por los diferentes componentes presentes en la muestra (algunos organelos especializados y células fotosensibles), para que finalmente una porción emerja al otro lado del tejido. En algunos casos cuando la muestra es lo suficientemente delgada, un porcentaje de la luz puede pasar a través de la muestra sin sufrir esparcimiento y de esta forma conservar sus propiedades inalteradas [26]. La luz que pasa a través de la muestra luego de sufrir esparcimiento y la componente retro-esparcida, transportan poca o ninguna información relacionada con la textura de las superficies, aun así dan valiosa información relacionada a la estructura interna del tejido [7]. Luego de ser esparcida numerosas veces, la luz suele perder trazo de su estado de polarización, por consiguiente, la luz proveniente de muestras biológicas generalmente presenta algún grado de despolarización.

Los efectos de esparcimiento pueden ser de dos tipos: elásticos e inelásticos. Si un fotón sufre esparcimiento elástico, éste cambia su dirección de propagación al igual que su estado de polarización acorde al modelo de polarización por reflexión, de esta

forma múltiples esparcimientos dan como resultado un conjunto de cambios aleatorios sobre la polarización de la luz generando así despolarización [25]. El esparcimiento elástico da noción del tamaño y distribución de los centros dispersores en la muestra [25]. El esparcimiento inelástico es más fácil de entender como un proceso de absorción y reemisión, en el que se dan ganancias o pérdidas en la energía de los fotones, cambiando así su longitud de onda. Adicionalmente en el esparcimiento inelástico existe una dependencia del estado de polarización incidente y reemitido. El esparcimiento inelástico da información de composición química y molecular en la estructura de los tejidos, por ejemplo en el seguimiento de la evolución de enfermedades, o en el estudio de proteínas [27].

La birrefringencia y el dicroísmo también suelen presentarse en los tejidos biológicos. Estas propiedades suelen presentarse debido a anisotropías en diversas estructuras fibrosas (tejidos musculares), o al carácter anisotrópico propio de algunas moléculas metabólicas como el colágeno, queratina y glucosa [26]. La birrefringencia está dada por una relación entre el índice de refracción que presenta el medio para un par de componentes ortogonales, por lo que en células elongadas, donde el tejido presenta características diferentes para la orientación en dirección de las fibras (dirección de elongación) y su dirección ortogonal, la información de retardo o birrefringencia de la muestra constituyen una importante técnica de contraste [25, 26].

La absorción de la luz es un mecanismo fundamental para el diagnóstico y algunas aplicaciones terapéuticas. Sin absorción, no habría transferencia de energía a los tejidos y ninguno de los dos, la luz o tejido se verían importantemente afectados [24]. Afortunadamente, la absorción constituye una de las principales fuentes de contraste en técnicas de imagen biológicas, y en particular cuando se trabaja con luz polarizada se pueden presentar efectos de dicroísmo o diatenuación [7]. Cuando existe diatenuación se habla de una absorbancia selectiva del medio, por lo que se tendrán diferentes imágenes y contrastes de la muestra dependiendo de la polarización que se utilice, esto permite resaltar determinadas estructuras o hacer seguimiento a algunos procesos al interior de las muestras [7].

Una de las razones por la cual las imágenes biomédicas pueden ser utilizadas para

detectar enfermedades o alteraciones en las condiciones de los tejidos, es debido a que éstos cambian las propiedades ópticas del medio, específicamente, el índice de refracción, absorción y el coeficiente de esparcimiento [24]. Como se ha presentado en este capítulo las propiedades ópticas de los medios pueden ser cuantificadas mediante el uso de métodos polarimétricos, lo que provee un mecanismo de contraste para la identificación y diagnóstico de alteraciones en el estado de muestras biológicas.

Referencias

- [1] S. Amelinckx, D. Van Dyck, J. Van Landuyt, and G. Van Tendeloo. *Handbook of Microscopy: Applications in Materials Science, Solid-State Physics, and Chemistry. Methods II*. John Wiley & Sons, 2008. [112](#), [123](#)
- [2] S. Bell and K. Morris. *An introduction to microscopy*. CRC Press, Boca Raton, Fla., 2010. [112](#)
- [3] H. C. Lee, R. Ramotowski, and R. E. Gaensslen. *An Introduction to Microscopy*. CRC press, 2001. [112](#), [113](#), [115](#), [116](#)
- [4] E. Hecht. *Optics*. Addison Wesley, 1301 Sonsomen St., San Francisco, United States, 4th edition, 2002. [113](#)
- [5] P. Hawkes and J. Spence. *Science of microscopy*. Springer Science & Business Media, 2008. [115](#), [116](#), [117](#)
- [6] A.G. Valdecasas, D. Marshall, J.M. Becerra, and J.J. Terrero. On the extended depth of focus algorithms for bright field microscopy. *Micron*, **32**(6):559 – 569, 2001. [116](#)
- [7] R. Liang. *Optical design for biomedical imaging*. Number 203 in SPIE PM. SPIE Press, Bellingham, Wash, 2010. [116](#), [120](#), [124](#), [125](#), [126](#), [157](#), [158](#)
- [8] L. T. Perelman, V. Backman, M. Wallace, G. Zonios, R. Manoharan, A. Nusrat, S. Shields, M. Seiler, C. Lima, T. Hamano, I. Itzkan, J. Van Dam, J. M. Crawford, and M. S. Feld. Observation of periodic fine structure in reflectance from

- biological tissue: A new technique for measuring nuclear size distribution. *Phys. Rev. Lett.*, **80**:627–630, Jan 1998. [117](#)
- [9] S. Echeverri, C. Cuartas, and C. Restrepo, R. ans Cano. Plataforma para la calibración de rotadores ópticos, registro de patente n. 13-58-269. *Dirección nacional de derechos de autor, Mininterior Colombia*, 2017. [119](#)
- [10] J.E. Greivenkamp. *Field Guide to Geometrical Optics*. Field Guide Series. Society of Photo Optical, 2004. [120](#), [121](#), [123](#)
- [11] H. Gross, F. Blechinger, and B. Ahtner. *Handbook of Optical Systems, Survey of Optical Instruments*. Handbook of Optical Systems. Wiley, 2008. [121](#)
- [12] S. B. Mehta and R. Oldenbourg. Image simulation for biological microscopy: microlith. *Biomedical Optics Express*, **5**(6):1822, June 2014. [123](#)
- [13] H. Gross, editor. *Handbook of optical systems*. Wiley-VCH, Weinheim, 2005. [124](#), [125](#), [141](#)
- [14] K. B. Doyle, V. L. Genberg, and G. J. Michels. *Integrated optomechanical analysis*. Number PM223 in SPIE Press. SPIE Press, Bellingham, Washington, USA, second edition edition, 2012. [124](#)
- [15] H. Fabricius and T. N. Hansen. Optimizing the phase retardation caused by optical coatings. *Proceedings SPIE*, page 71011I, 2008. [125](#)
- [16] M. Shribak, S. Inoue, and R. Oldenbourg. Polarization aberrations caused by differential transmission and phase shift in high numerical aperture lenses: theory, measurement, and retification. *Optical Engineering*, **41**:41 – 41 – 12, 2002. [127](#)
- [17] J. P. McGuire and R. A. Chipman. Diffraction image formation in optical systems with polarization aberrations. i: Formulation and example. *J. Opt. Soc. Am. A*, **7**(9):1614–1626, 1990. [128](#)
- [18] T. Tojyo. *Microscope Objective Lens System*. Patent number : 786937, Tokyo, Japan, 1977. [133](#), [134](#)

-
- [19] W. J. Smith. *Modern optical engineering: the design of optical systems*. McGraw Hill, New York, 3rd ed edition, 2000. [138](#)
- [20] R. K. Attota. Step beyond Kohler illumination analysis for far-field quantitative imaging: angular illumination asymmetry (ANILAS) maps. *Optics Express*, **24**(20):22616, October 2016. [147](#)
- [21] J.W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill physical and quantum electronics series. W. H. Freeman, 2005. [150](#)
- [22] E. Samei, M. J. Flynn, and D. A. Reimann. A method for measuring the pre-sampled MTF of digital radiographic systems using an edge test device. *Medical physics*, **25**(1):102–113, 1998. [150](#), [153](#)
- [23] J.M. Geary. *Introduction to Lens Design: With Practical ZEMAX Examples*. Willmann-Bell, 2002. [152](#)
- [24] V. Tuchin. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. SPIE Digital Library. SPIE, 2015. [156](#), [157](#), [158](#), [159](#)
- [25] S. Jacques. Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine & Biology*, **58**(11):R37, 2013. [156](#), [158](#)
- [26] V. Tucin, L. Wang, and D. Zimnjakov. *Optical polarization in biomedical applications*. Biological and medical physics, biomedical engineering. Springer, Berlin Heidelberg New York, 2006. [157](#), [158](#)
- [27] L.V. Wang and H. Wu. *Biomedical Optics: Principles and Imaging*. Wiley, 2012. [158](#)

Capítulo 5

Medidas experimentales y análisis de resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos mediante la observación de algunas muestras de fácil adquisición, entre las que tenemos: un polarizador líneal como muestra de control, un circuito impreso mediante fotolitografía, cinta celofán, un diente, una cebolla, almidón, hojas de un árbol y un cabello. Las imágenes son analizadas de manera que se aprecie las ventajas de utilizar un sistema de microscopía con luz polarizada, y algunas de ellas son interpretadas con base en resultados reportados en la literatura. Adicionalmente, se presenta una sección final con la técnica de multimonoscopía, utilizada para obtener topografía en una muestra.

5.1. Medidas de polarización del microscopio de luz polarizada

5.1.1. Muestra 1: polarizador líneal

La primera muestra que se analizó fue un polarizador líneal, utilizado como muestra de control ya que se conoce cómo debe ser su comportamiento y permite corroborar fácilmente si la medida es correcta. Debido a que los polarizadores comerciales son homogéneos, se espera una imagen plana en la que los pequeños cambios o puntos en

la imagen se deban a motas de polvo u otras partículas. Esto puede observarse en la Fig. 5-1, en donde las medidas se aproximan a una imagen plana. En el caso de la imagen de retardo su valor promedio es igual a cero, este resultado es consistente ya que en principio los polarizadores son diatenuadores ideales que no presentan birrefringencia [1]. La medida de la diatenuación es un poco ruidosa, en parte, esto se debe a que un polarizador ideal es un elemento que está en el límite de la sensibilidad de medida en medios con propiedades polarimétricas tal como se mencionó en la sección (2.7.1), aun así, se observa que el polarizador se aproxima a una diatenuación de uno, esto significa que solamente deja pasar una de las componentes ortogonales del campo eléctrico. Finalmente se observa que el polarizador presenta un polarizancia de uno y despolarización de cero, consistente con la definición de un polarizador ideal [2]. Este tipo de técnica puede utilizarse para medir la calidad de los elementos polarimétricos, aunque dicha propuesta no se llevó a cabo en este trabajo.

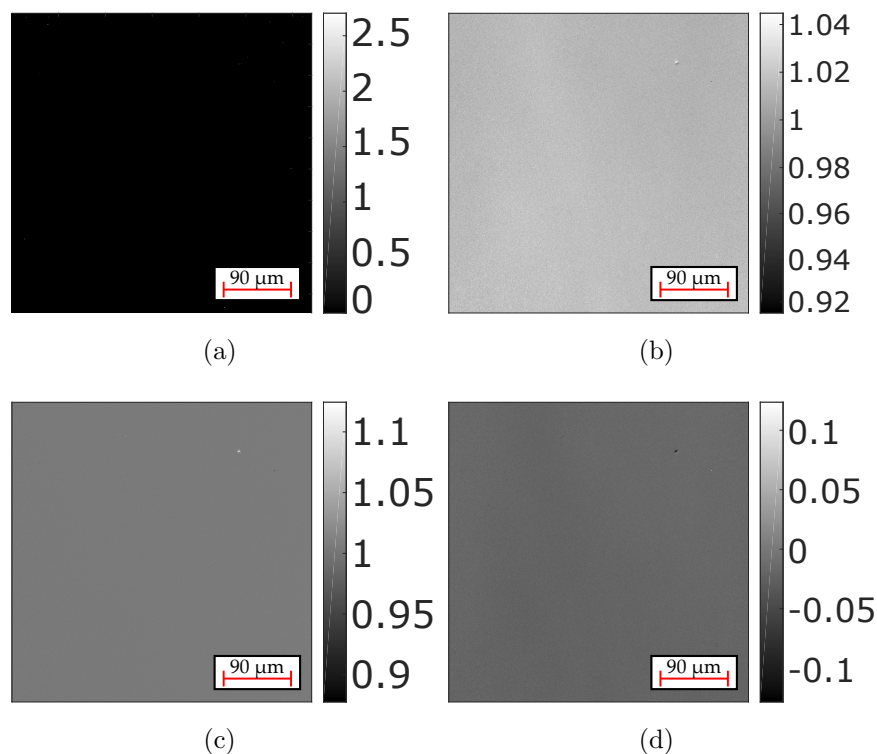


Figura 5-1: Imágenes polarimétricas de un polarizador lineal. (a) Imagen de retardo de fase en radianes [rad], (b) diatenuación en unidades arbitrarias [u.a.], (c) polarizancia en unidades arbitrarias [u.a.], (d) despolarización en unidades arbitrarias [u.a.].

5.1.2. Muestra 2: circuito impreso

Se presenta una segunda medida realizada sobre un registro hecho mediante fotolitografía, proporcionado por la línea de microingeniería del Grupo de Electromagnetismo Aplicado de la Universidad EAFIT. Las medidas fueron realizadas a reflexión con una magnificación de 10X, y se puede observar el resultado obtenido en la Fig. 5-2(a), donde se presenta únicamente el retardo introducido por el medio, ya que la muestra es especular y no introduce ningún otro efecto apreciable sobre la polarización de la luz [3]. En la Fig. 5-2(a), se evidencian los retardos propios del sistema de microscopia a reflexión, estos fueron calculados en la sección de caracterización del instrumento y pueden ser utilizados para corregir la imagen, obteniendo el resultado presentado en la Fig. 5-2(b), donde se puede observar la diferencia entre el substrato y el compuesto utilizado en la capa de registro [4]. La corrección se puede realizar de dos maneras: la primera es restar la POTF de retardo del microscopio de la imagen de retardo de la muestra, tal como se ha implementado en este caso; la segunda opción es multiplicar las matrices de Mueller de la muestra por la matriz de Mueller inversa del microscopio y recalcular el retardo. Mediante esta medida se quiere presentar la capacidad de la técnica para diferenciar compuestos.

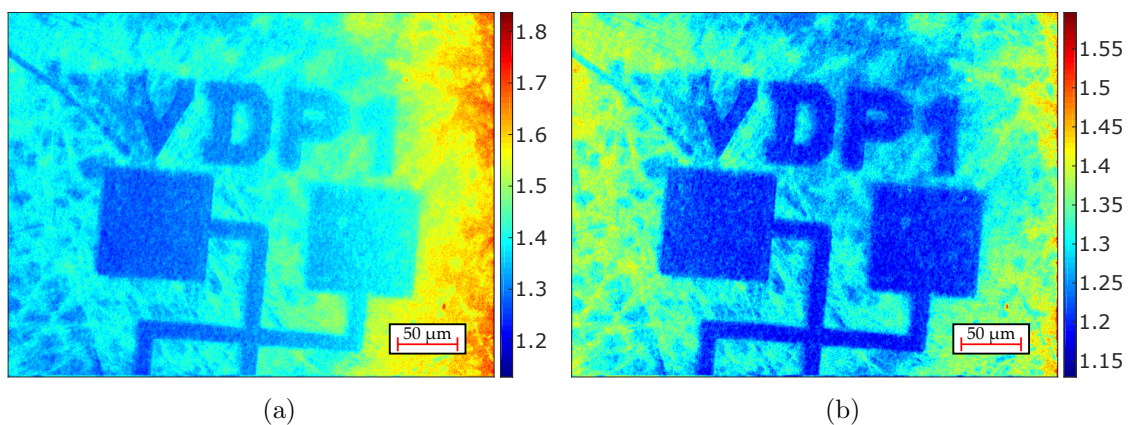


Figura 5-2: Imagen de retardo en radianes [rad] para un circuito por fotolitografía. (a) Sin corrección de aberraciones polarimétricas del sistema y (b) con corrección.

5.1.3. Muestra 3: cinta celofán sobre una moneda

En la Fig. 5-3 se presenta una moneda de 200\$ que ha sido cubierta con algunos trozos de cinta celofán, material ampliamente utilizado por presentar actividad óptica asociada a la polarización, y empleado para ejemplificar fenómenos como la birrefringencia por esfuerzo [5]. En la Fig 5-4 se presentan las imágenes de retardo, orientación de ángulo y despolarización para la zona señalada a través de un recuadro rojo en la Fig. 5-3, esta medida se realizó sin utilizar el microscopio, empleando únicamente un sistema de imagen 2F, con el propósito de observar la diferencia entre una imagen obtenida en escala real y una imagen microscópica.



Figura 5-3: Moneda de 200\$ observada mediante el microscopio. El zona en el marco rojo fue observada con un sistema de formación de imagen convencional y la azul mediante el sistema de microscopía desarrollado.

En las imágenes de retardo (Fig. 5-4(a)) y ángulo de orientación (Fig. 5-4(b)) se puede observar la distribución de los trozos de cinta la cual no sería directamente apreciable en una imagen de campo claro convencional [5]. En la imagen de retardo se observan tres grandes zonas, una roja y dos azules con un retardo promedio de 2,7 y 0,52 radianes respectivamente; la primera conjetura que se suele realizar es que las dos regiones azules generan el mismo cambio sobre la polarización de la luz, pero dicha apreciación no es cierta, ya que los retardos entre componentes se dan acorde a la dirección de los ejes principales del medio, por lo cual si observamos la Fig. 5-4(b) encontraremos que en ambas regiones los ángulos de orientación de los ejes rápidos

del medio tienen signo contrario, esto significa que si bien ambas regiones introducen el mismo desfase, el estado de polarización generado por estos rotarán en sentidos opuestos, además los semiejes principales de las elipses de polarización serán aproximadamente ortogonales. Por otro lado, la imagen de despolarización permite hacerse una modesta idea de los niveles o alturas en la moneda, ya que las regiones elevadas de la muestra son más rugosas y por consiguiente generan una mayor despolarización [6, 7].

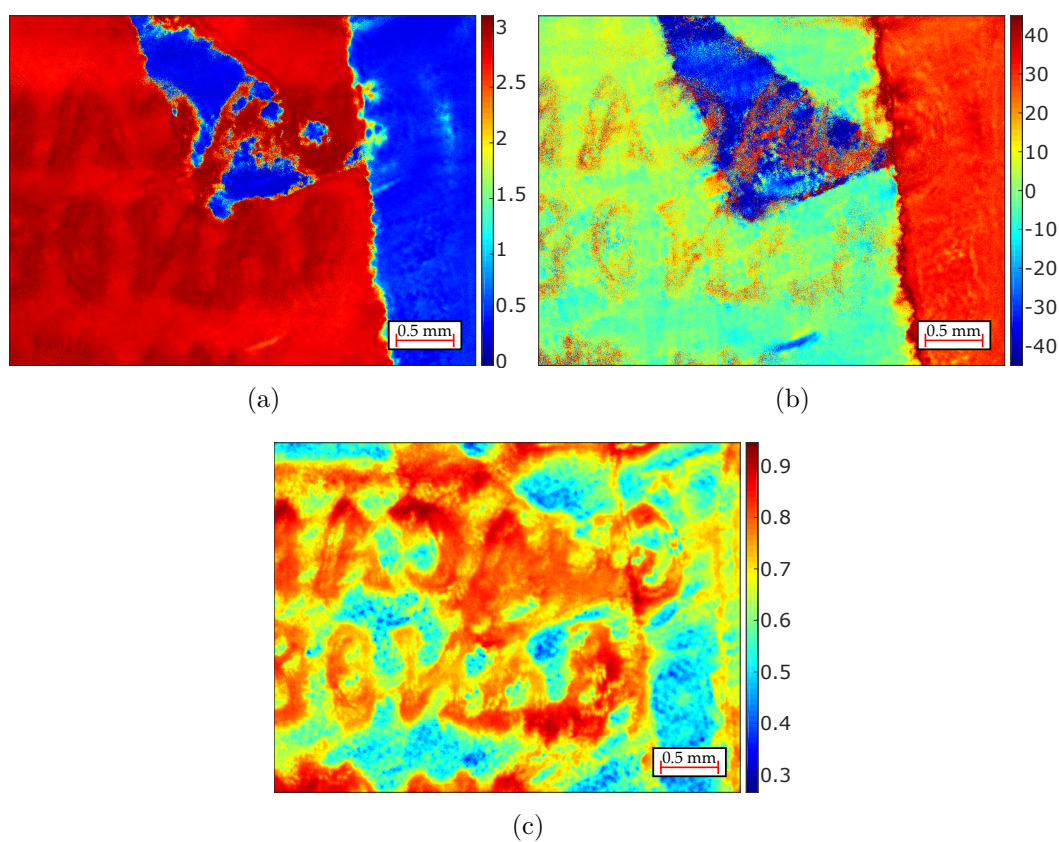


Figura 5-4: Medición de una moneda con cinta celofán para: (a) retardo de fase en radianes [rad], (b) ángulo de orientación del elemento en grados [°] y (c) despolarización en unidades arbitrarias [u.a.].

Un segundo conjunto de imágenes se presenta en la Fig. 5-5, esta vez adquiridas utilizando el microscopio a reflexión con un objetivo de 10X, la región observada esta descrita a través de un recuadro azul en la Fig. 5-3 . En las imágenes obtenidas a través del microscopio se observa que las medidas no son correspondientes con las que se presentan en la Fig. 5-4, esto se debe a la corta longitud de foco de los sistema

de microscopia, donde la luz colectada no proviene de la misma cantidad de planos de enfoque que en un sistema 2F, por lo cual las medidas obtenidas presentan un comportamiento más local de la polarización de la luz y no un valor promedio.

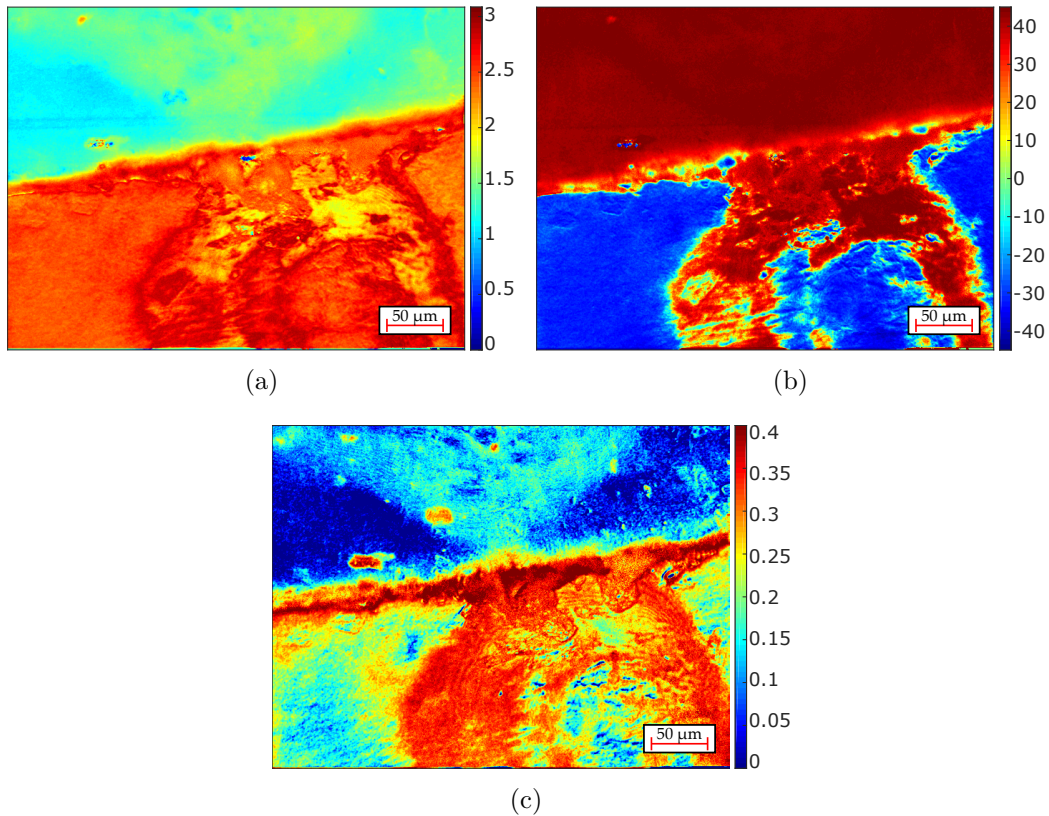


Figura 5-5: Medición de una moneda con cinta celofán a 10X para: (a) retardo de fase en radianes [rad], (b) ángulo de orientación del elemento en grados [°] y (c) despolarización en unidades arbitrarias [u.a.].

5.1.4. Medida 4: diente

Una aplicación que ha tenido mucho éxito relacionada a la medición de efectos polarimétricos es el estudio de dientes [8]. Mediante su implementación en OCT, una técnica de escaneo en profundidad no invasiva, es posible utilizar técnicas de polarimetría convencionales para obtener información asociada al estado de la dentina y otros compuestos presentes en los dientes, permitiendo la identificación de caries y otras enfermedades [8]. Las caries se dan por la concentración de placa bacteriana en los dientes, la cual fabrica ácidos a partir de los alimentos a los que se encuentran

expuesta [9]. Estos ácidos actúan sobre la capa exterior del diente llamada esmalte, dando paso a un proceso denominado desmineralización, a partir del cual el esmalte empieza a tener una deficiencia en su concentración de minerales, lo cual deja expuesta la dentina al ataque de otros compuestos bacterianos [9, 10]. Las caries no son apreciables a simple vista, por lo que se suele utilizar colorantes para su identificación. Utilizando técnicas polarimétricas es posible detectar la presencia de caries, ya que el proceso de demineralización causa que el esmalte del diente presente irregularidades en su estructura, aleatorizando los cambios que se dan en la polarización de la luz que interactúa con la zona afectada, esto se traduce en un aumento en la despolarización causada por las regiones con caries en el diente [9–11]. En la Fig. 5-6 se presenta la imagen de un diente en el que se pueden observar zonas con un grado de despolarización elevado en comparado con el resto de la imagen, lo que acorde al estado del arte indica la posible presencia de caries en el diente [9–11].

5.1.5. Muestra 5: tejido epidermis cebolla

En la Fig. 5-7(a) se presenta la imagen de la epidermis de una cebolla, la cual se encuentra opacada por una segunda estructura ubicada en una capa posterior lo suficientemente cercana para ser tomada por el objetivo de microscopio. Dicha estructura proviene de una gota de agua que se depositó en superposición con la muestra, durante su montaje en el portaobjetos. Una de las aplicaciones de las técnicas de imagen polarimétrica consiste en observar muestras con actividad óptica sobre la polarización a través de medios turbios [12, 13], siendo la observación de objetos inmersos en fluidos una de sus principales implementaciones [14]. En la Fig. 5-7(b) se muestra la imagen de retardo de la cebolla, donde se aprecia cómo se resaltan las paredes celulares orientadas en dirección horizontal y en menor medida aquellas en dirección vertical, con la particularidad de que en esta imagen no se observan los efectos del medio turbio, facilitando la identificación de las paredes de las células [15]. Esta propiedad es utilizada en la observación de tejidos fibrosos, como los musculares, en los cuales las células tienen una orientación principal al igual que las células de cebolla, permitiendo resaltar estructuras periódicas [16, 17]. En la imagen de despolarización

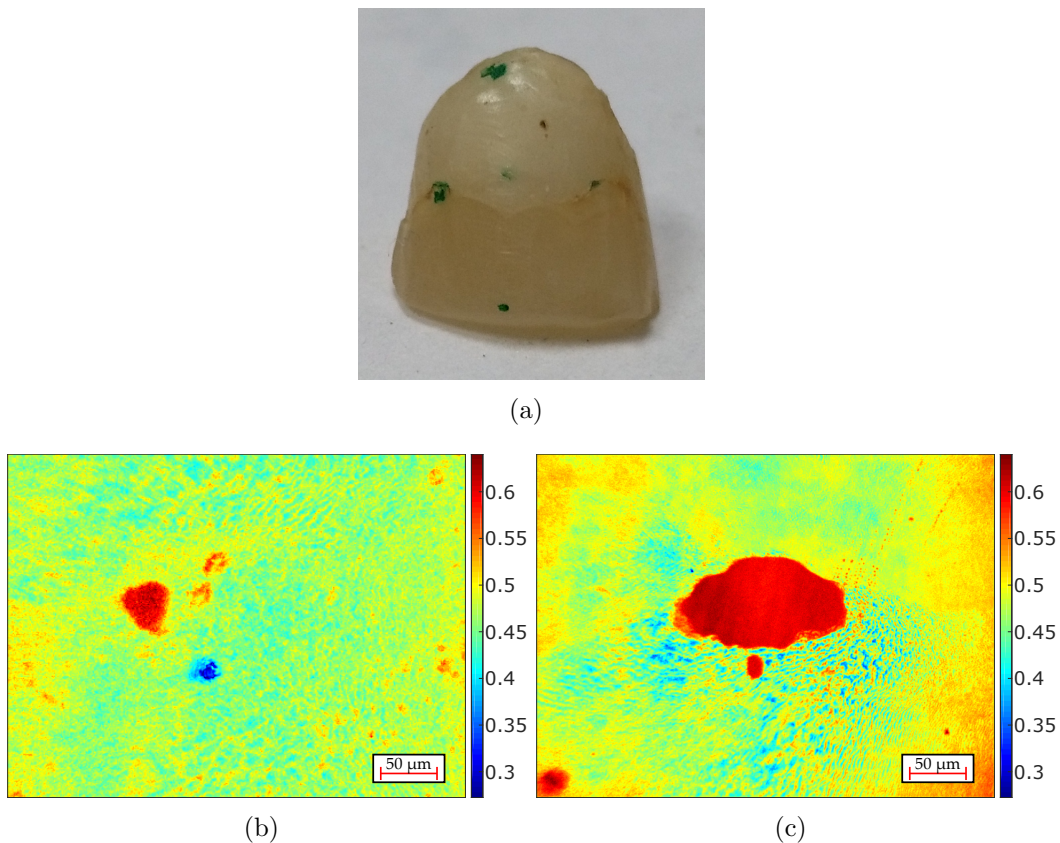


Figura 5-6: (a) es la imagen del diente observado. (b) y (c) son ejemplos de identificación de caries en dientes mediante la realización de medidas de despolarización [u.a.].

se conservan la mayoría de las características de la imagen original, con la particularidad de que esta presenta una textura similar a las imágenes obtenidas mediante microscopía de campo oscuro.

5.1.6. Muestra 6: almidón

El almidón es un compuesto biológico presente en una gran variedad de alimentos como cereales, pan y varios tubérculos. La información asociada al contenido de almidón en los alimentos puede ayudar a obtener información nutricional, por lo que existen métodos de tinción para la identificación de almidón en medidas de microscopio tal y como se presenta en la Fig. 5-8. El almidón también genera un cambio representativo sobre el estado de polarización de la luz [18], como se presenta en las Figs. 5-9(a) y 5-9(b), en donde se observan las imágenes de retardo y ángulo de orien-

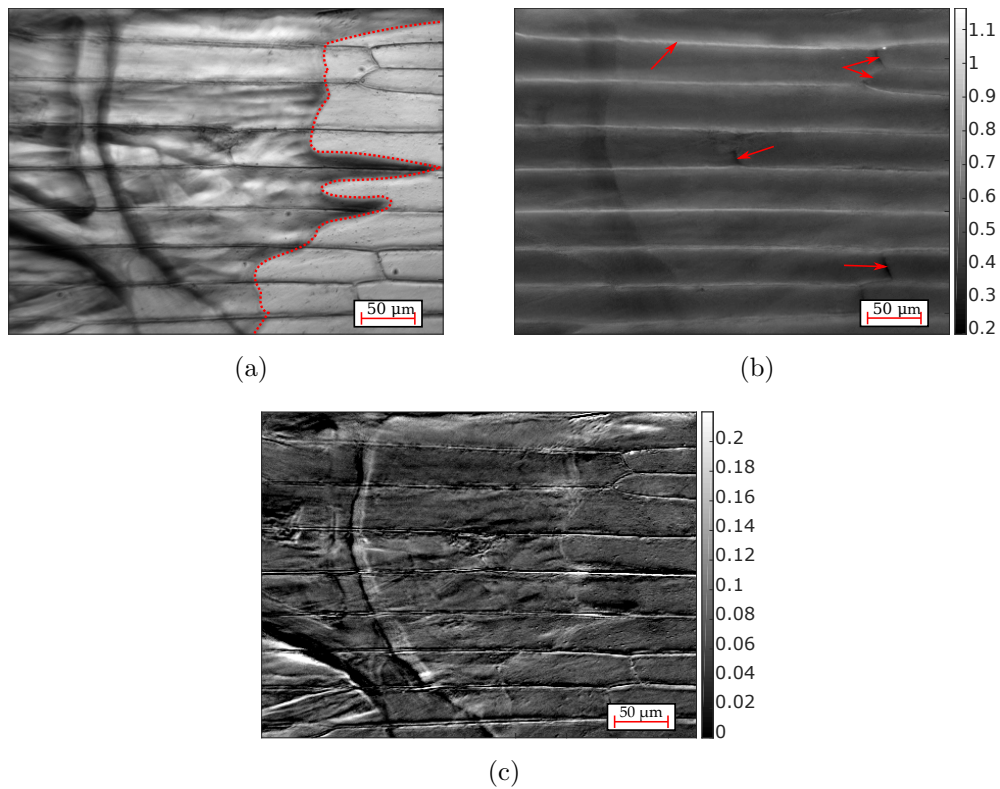


Figura 5-7: Imagen de una cebolla observada en un microscopio a trasmisión con un aumento de 10X. (a) Imagen de campo claro, (b) imagen de retardo de fase en radianes [rad], (c) imagen de despolarización en unidades arbitrarias [u.a.].

tación para un conjunto de granos de almidón. Los granos de almidón en la imagen son fácilmente identificables, ya que estos presentan cambios representativos en su retardo y ángulo de rotación en comparación con el background. La birrefringencia es la propiedad óptica del almidón que afecta en mayor medida al estado de polarización de la luz, por lo que esta muestra se suele evaluar a partir de sus efectos de retardo.

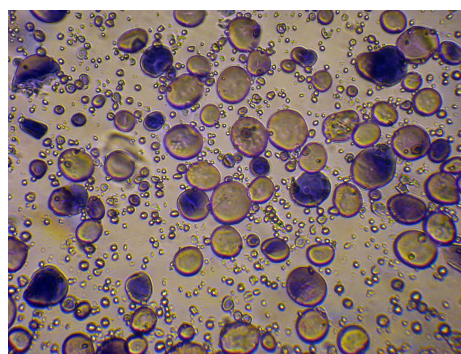


Figura 5-8: Muestra de almidón observada mediante tinción. Tomada de [19].

Un ejemplo de cómo se puede utilizar las técnicas de polarimetría para la caracterización de alimentos se presenta en las Figs. 5-9(c) y 5-9(d). En estas imágenes se tiene un corte fino del interior de una papa observada a transmisión en el microscopio, muestra seleccionada por su rico contenido en almidón. En las imágenes de retardo y ángulo de orientación, se puede observar que a lo largo de toda la imagen se dan cambios en sus propiedades ópticas, a excepción de las zonas demarcadas por una línea negra, en donde el retardo del medio parecieran presentar un valor constante. Estas zonas indican la ausencia de almidón ya que no se presenta la birrefringencia característica de este compuesto. Midiendo la concentración de almidón por unidad de área en varias muestras provenientes del mismo alimento es posible realizar una estadística de su contenido de almidón [20]. En la medida realizada se utilizó una máscara (obtenida a partir de la varianza de la muestra) para el cálculo del contenido de almidón en la muestra, para la que se obtuvo una concentración del 94,8% por unidad de área.

5.1.7. Muestra 7: hojas de árbol

Se analiza un conjunto de tres hojas provenientes de la misma planta en diferente estado de decoloración: Una verde, otra amarilla y finalmente una seca. Este análisis se realiza para demostrar el potencial de la técnica en la detección de patologías y el estudio de las propiedades fisiológicas de las plantas. La idea de este estudio nace de la observación de los vectores de propagación de enfermedades en plantas, los cuales suelen ser insectos como las pulgas, moscas y arañuelas [21]. Al estudiar el comportamiento de los vectores Mauck et al. [22, 23] determinaron que la manera en la que se diseminaban los patógenos parecía estar ligada a la capacidad de los vectores para determinar las condiciones de las plantas, ya que estos generalmente seleccionaban plantas saludables [22, 23]. Sumado al hecho de que algunos insectos poseen sistemas de visión sensibles a la luz polarizada [24], permitió llegar a la conclusión de que el estado de polarización de la luz reflejada por las plantas podía dar información de sus cualidades nutricionales, que están directamente relacionadas con sus capacidades fotosintéticas, al igual que con el contenido de minerales, azúcares y agua [25, 26].

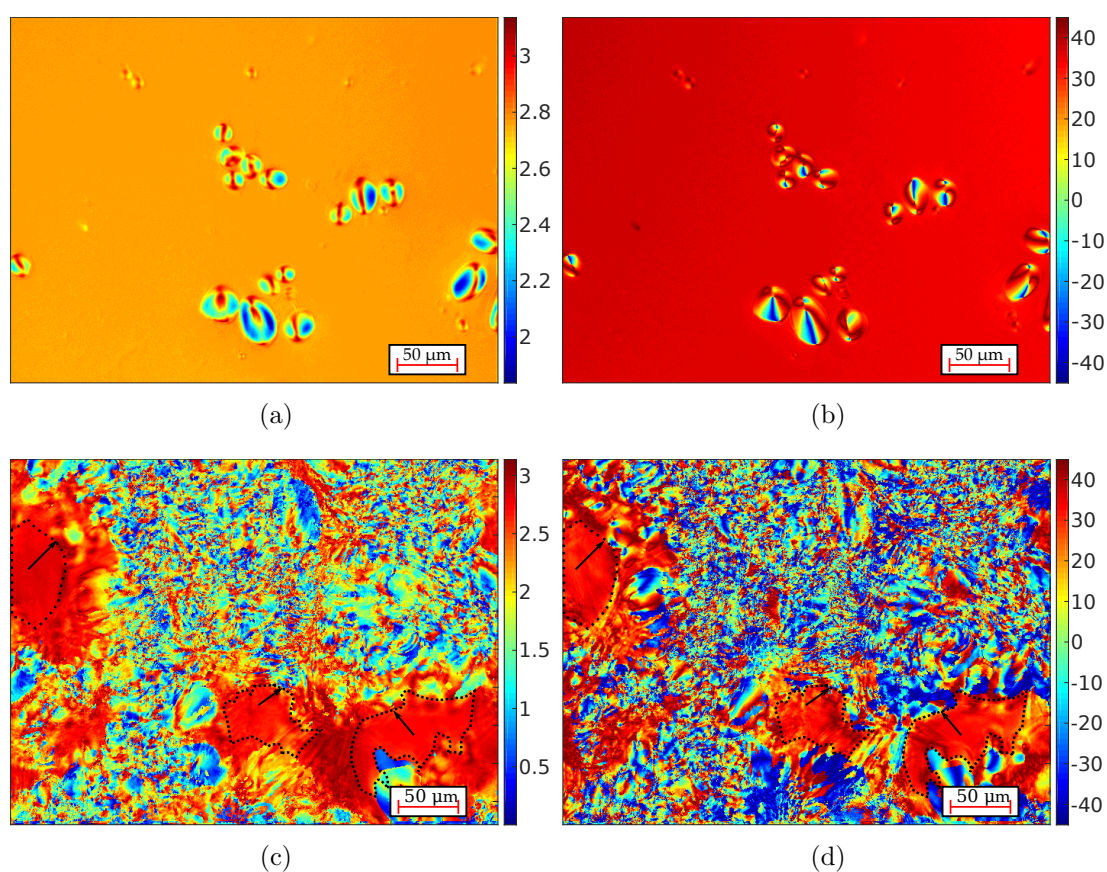


Figura 5-9: Medidas de microscopía de luz polarizada para la identificación de almidón. (a) y (b) retardo [rad] y ángulo [°] de orientación en granos de almidón, (c) y (d) retardo [rad] y ángulo [°] de orientación en papa.

En la Fig. 5-10 se presenta la imagen de las tres hojas utilizadas para realizar la comparación. La primera es una hoja verde característica de una planta sana y madura con una actividad fotosintética normal. La segunda es una hoja amarilla que se encuentra en clorosis [27], es decir ha comenzado a presentar deficiencia fotosintética y está en proceso de deshidratación. En último lugar una hoja seca, estado en el que se encuentran las hojas poco antes de desprenderse de su planta de origen.

En la Fig. 5-11 se presenta la imagen de despolarización para las tres hojas. Las imágenes se tomaron utilizando el modo a reflexión del microscopio, empleando un objetivo de 20X, y procurando observar una zona sin venas. A partir de las figuras no es fácil discernir cuál de ellas presenta la mayor despolarización, por lo cual se calcula el histograma de cada imagen. En la Fig. 5-12 se presenta el histograma normaliza-

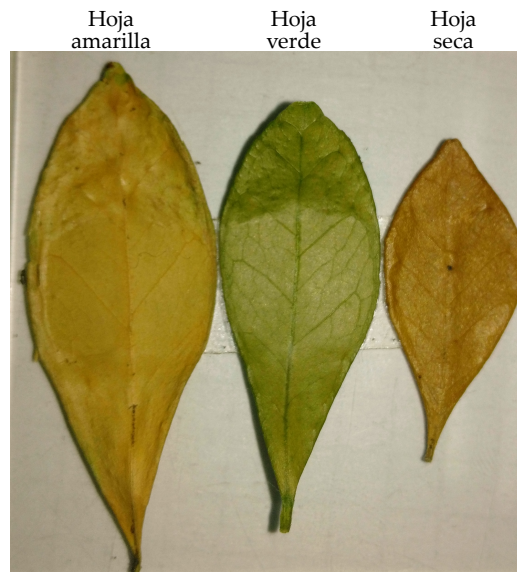


Figura 5-10: Hojas utilizadas como muestra para el análisis cuantitativo de efectos polarimétricos.

do de las tres imágenes, el cual se normaliza ya que no se necesita saber el número de cuentas, sino el valor de despolarización que es más frecuente en cada muestra, además, normalizar facilita la visualización de los datos. En la literatura se plantea que la despolarización introducida por una hoja sana es relativamente alta [25, 28], y esta puede variar dependiendo de las condiciones de salud de la planta [29], en nuestro caso obtuvimos que la hoja verde presenta la menor despolarización seguida por la amarilla y finalmente la seca, dando a entender que a medida que la planta presenta menos actividad fotosintética, aumenta la despolarización que introduce. Estos resultados presentan la utilidad de realizar mediadas polarimétricas para evaluar pequeños cambios en las características fisiológicas de las plantas. Las enfermedades suelen introducir cambios más grandes, por lo que son más fáciles de identificar y pueden ayudar a la prevención e identificación de patógenos [25].

Para finalizar, en la Fig. 5-11(a), se puede observar una zona amarilla en medio de la imagen, indicando una despolarización más alta en este punto. Recordemos que las muestras biológicas no son homogéneas y suelen presentar irregularidades, al igual que sucede con el epitelio humano en el que se presentan lunares u otras estructuras. La identificación de la naturaleza de la zona amarilla presente en la Fig. 5-11(a) está

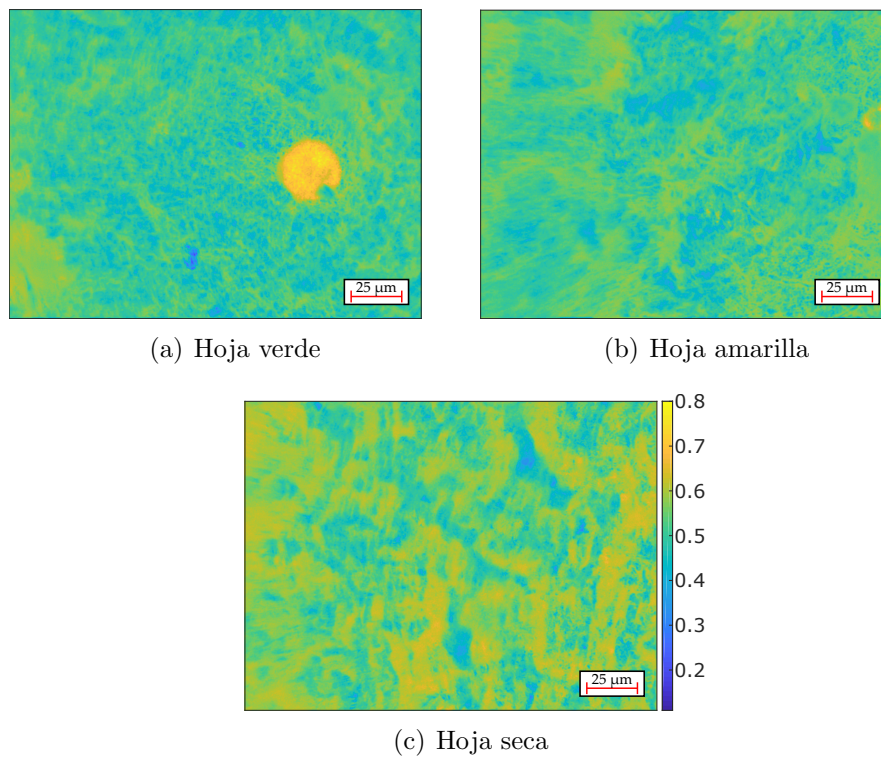


Figura 5-11: Imágenes de despolarización [u.a.] en hojas observadas con el microscopio de luz polarizada a 20X.

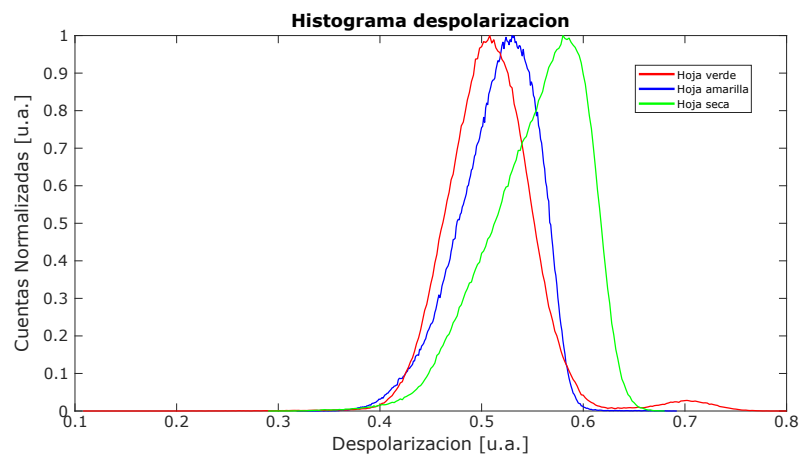


Figura 5-12: Histograma para la medición cuantitativa de la despolarización en las diferentes hojas observadas.

fuera del alcance de este trabajo, no obstante, es importante mencionar como esta no afecta la medida realizada a través del histograma de las imágenes. Este resultado es importante ya que demuestra que pequeñas irregularidades no afectan el resultado de la medida, adicionalmente, para un valor aproximado a 0,7 en la despolarización

se observa un pequeño pico en el histograma, el cual está asociado a la estructura amarilla de la Fig. 5-11(a), cuya identificación indica que pequeñas irregularidades en las muestras también puede ser utilizadas para la caracterización.

5.1.8. Muestra 8: cabello humano

Otra aplicación se encuentra en la industria donde se utilizan mediciones polarimétricas para la caracterización del espesor de fibras [30, 31]. En este trabajo se evaluó la posibilidad de utilizar el mismo concepto en el cabello, para ello se tomó un cabello humano y se observó a transmisión utilizando un objetivo de 40X, obteniendo la imagen presentada en la Fig. 5-13(a). Para conocer el espesor de las fibras se utiliza la imagen de retardo de las muestras, ya que este es proporcional al espesor del medio. En las Figs. 5-13(b) y 5-13(c), se presenta la imagen de retardo y de ángulo de orientación obtenidas para el cabello.

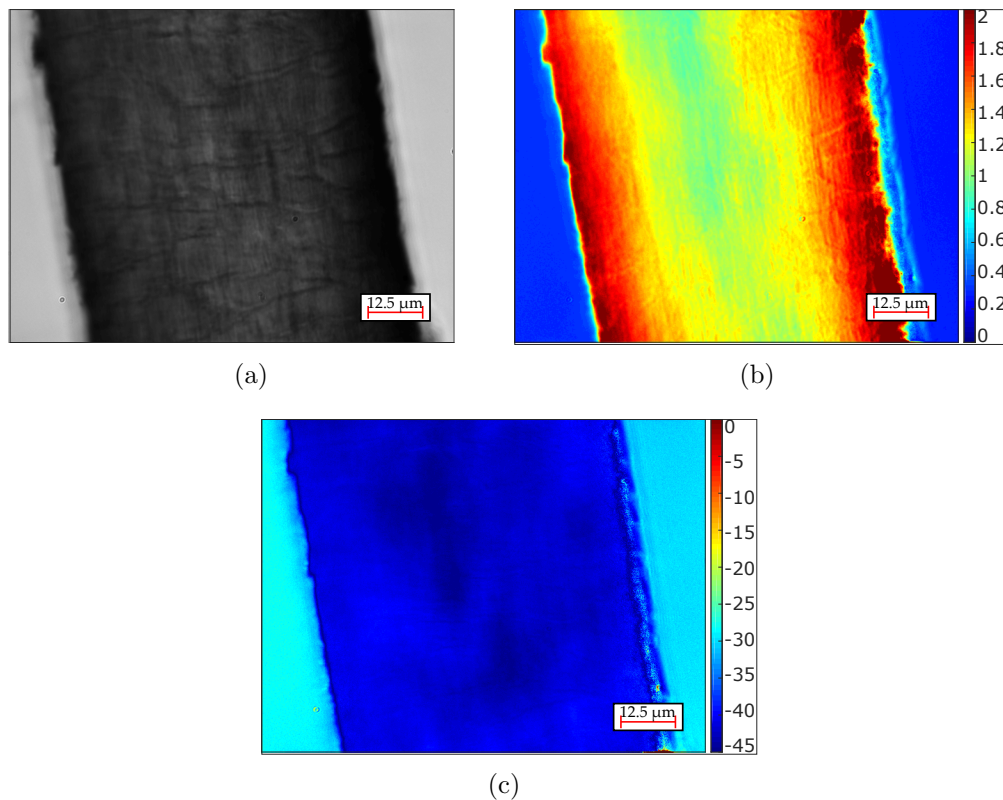


Figura 5-13: Cabello humano con manificación de 40X. Imágenes de: (a) campo claro, (b) retardo [rad] y (c) ángulo de orientación [°].

A simple vista se puede observar como en la imagen de retardo (Fig. 5-13(b)), la magnitud pareciera ir disminuyendo a medida que nos acercamos al centro del cabello, lo cual en base a la definición del retardo ($\delta = 2\pi\Delta nL/\lambda$) indicaría que espesor del cabello está cambiando, ya que se asume que la birrefringencia del medio (Δn) es constante. Ahora, consideremos que el espesor del cabello aumenta a medida que nos acercamos al centro en la Fig. 5-13(b), esta es una afirmación intuitiva pero no evidente en la medida, ya que el retardo disminuye en vez de aumentar. Utilizando la información presentada en la Fig. 5-13(c) sabemos que el desfase que se da entre las componentes del campo es negativo, esto debido al marco de referencia utilizado para la definición de polarización dextrógira y levógira, donde ángulos positivos dan paso a desfase positivos (polarización dextrógira) y ángulos negativos dan paso a desfase negativos (polarización levógira), de allí que el retardo disminuya en lugar de aumentar. Dado que no conocemos la birrefringencia de un cabello no podemos calcular su espesor, pero modelando este como un elemento con simetría radial, podemos utilizar su espesor para caracterizar la birrefringencia del cabello humano. En la Fig. 5-14 se presenta el perfil del cabello, tomando el ancho de su sección transversal ($\approx 70\mu\text{m}$) como diámetro del cabello podemos calcular su birrefringencia en diferentes puntos mediante la expresión para el retardo ($\delta = 2\pi\Delta nL/\lambda$). El valor de la birrefringencia promedio para el cabello humano utilizado en las medidas, es de aproximadamente $1,21 \times 10^{-3}$.

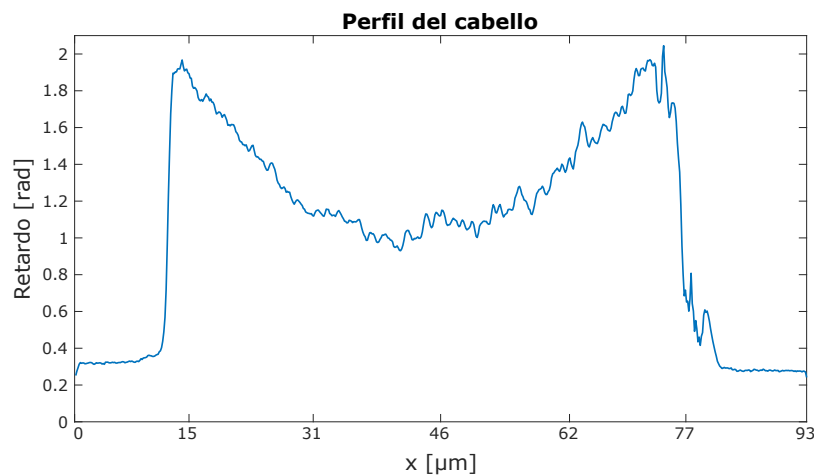


Figura 5-14: Perfil de imagen de retardo en un cabello.

5.2. Multimonoscopia para la reconstrucción de objetos 3D

La mayor dificultad al momento de obtener imágenes 3D en un microscopio óptico es la corta profundidad de foco que estos poseen, la cual hace imposible obtener una imagen nítida de un objeto tridimensional [32]. Existen muchas técnicas alternativas para la observación de muestras tridimensionales, entre las que encontramos los métodos interferométricos como las técnicas de microscopía holográfica o microscopía óptica de coherencia (*Optical Coherence Microscopy*. OCM), las cuales trabajan dentro del límite de la resolución óptica, y requieren implementaciones adicionales sobre el sistema óptico como lo es la adición de un brazo de referencia para la implementación de un interferómetro. Una solución alternativa para la obtención de imágenes 3D mediante un microscopio, consiste en generar una única imagen a través de la combinación de diferentes capas independientes. Esta idea fue formulada por Martisek et al. [33], donde utilizando la corta profundidad de foco del objetivo de microscopio es posible obtener una imagen cuyas regiones de mayor nitidez correspondan a un determinado plano de enfoque, por lo cual al tomar imágenes en diferentes planos es posible encontrar sus correspondientes regiones de mejor enfoque, y así interpolar la topografía de la muestra [33].

La técnica se puede pensar como si cada imagen tomada con el microscopio fuera un corte del volumen de la muestra, donde las regiones con mayor contraste definen los límites del objeto en dicho plano [34]. Para determinar las regiones de la imagen en donde se tiene mayor contraste se utiliza la varianza como criterio de nitidez. Dicha varianza se calcula al recorrer la imagen utilizando un kernel dado por la siguiente expresión [34]:

$$v_{xy}(Z) = \frac{1}{n^2} \sum_{i=x-k}^{x+k} \sum_{j=y-k}^{y+k} (I_{ij} - \bar{I})^2 \quad (5.1)$$

donde, $v_{xy}(Z)$ es la varianza de la Z -ésima capa en la posición x, y , correspondientes a las coordenadas de un pixel en la imagen, n es el tamaño del kernel utilizado y

$k = (n - 1)/2$ es un parámetro utilizado para determinar el recorrido del kernel, I_{ij} es la intensidad en nivel de gris del pixel en una posición (x, y) e \bar{I} es el valor promedio de los pixeles contenidos por el kernel.

La imagen en cada plano estará dada por los pixeles que presentan mayor varianza para un punto x, y . Para ejemplificar el funcionamiento del método se puede observar la Fig. 5-15, en esta se presenta la imagen de una manzana y algunas secciones transversales, las cuales si fueran adquiridas a través de un sistema óptico se obtendrían las características del plano de mejor enfoque sumado a las imágenes desenfocadas de los planos aledaños. Calculando la varianza en cada plano se pueden obtener los detalles correspondiente para los diferentes plano de enfoque.

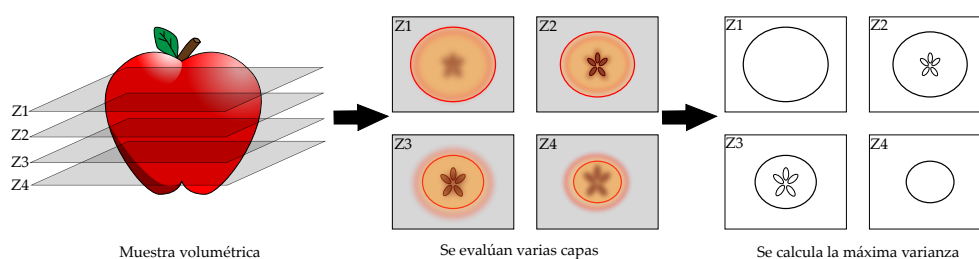


Figura 5-15: Esquema para la descripción del método de reconstrucción 3D mediante multimonoscopia.

Para la implementación de esta técnica en el microscopio desarrollado no se cuenta con un sistema automatizado, se debe desplazar el tornillo micrométrico empleado para encontrar el mejor plano de enfoque y obtener imágenes polarimétricas de la muestra en diferentes planos y con estas calcular sus varianzas. Los resultados obtenidos se presenta mediante la medición de la epidermis de una cebolla con una magnificación de 20X, y un muestreo en pasos de $3\mu\text{m}$ a lo largo de 41 capas para obtener un escaneo de $120\mu\text{m}$ en z .

En la Fig. 5-16 se presenta la imagen en el plano $x - y$ correspondiente a la superposición de los diferentes planos de la muestra, además de un par de secciones transversales que dan información del volumen en los planos $x - z$ y $y - z$. El volumen obtenido se calculó mediante la información de despolarización de la cebolla, donde se conserva la mayoría de las características de la muestra. En la sección trasversal presentada en el plano $x - z$ se puede observar un par de regiones correspondientes

a secciones transversales de la membrana celular de la cebolla, permitiendo medir el espesor de esta que es de aproximadamente $32\mu\text{m}$, un poco por encima del valor presentado en la literatura el cual oscila entre $20 - 30\mu\text{m}$ [35], efecto asociable a que la muestra se encontraba sumergida en agua, por lo cual el proceso de hidratación pudo llevar a que la muestra aumentara su espesor [35]. En la imagen del plano $y - z$ se pueden observar los marcadores A y B correspondientes a estructuras que se encontraban por debajo de la membrana celular, ejemplificando la capacidad de la técnica para identificar diferentes estructuras en varios planos. Las imágenes en los planos $x - z$ y $y - z$ han sido interpoladas para facilitar la visualización, además las dimensión en z no corresponde con las de x , y .

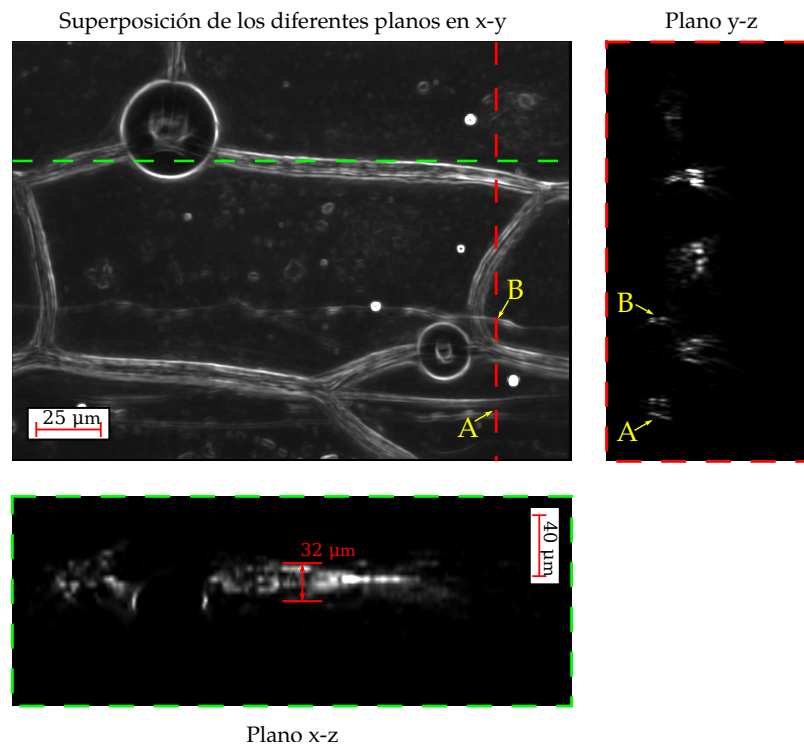


Figura 5-16: Información para diferentes planos de observación obtenida mediante el método de multimicroscopía en la información de despolarización del tejido epitelial de cebolla.

La Fig. 5-17 presenta el volumen obtenido para las imágenes de retardo en la célula. Un resultado muy interesante se puede evidenciar, ya que en el volumen obtenido solamente cuenta con información correspondiente a la membrana celular [15], condición que ya se había presentado en la observación de una cebolla en la sección

anterior. Debido a la simplicidad del volumen comparado con respecto a los resultados obtenidos en la Fig. 5-16 se aplicó un postprocesamiento para mejorar la el contraste de las imágenes obtenidas.

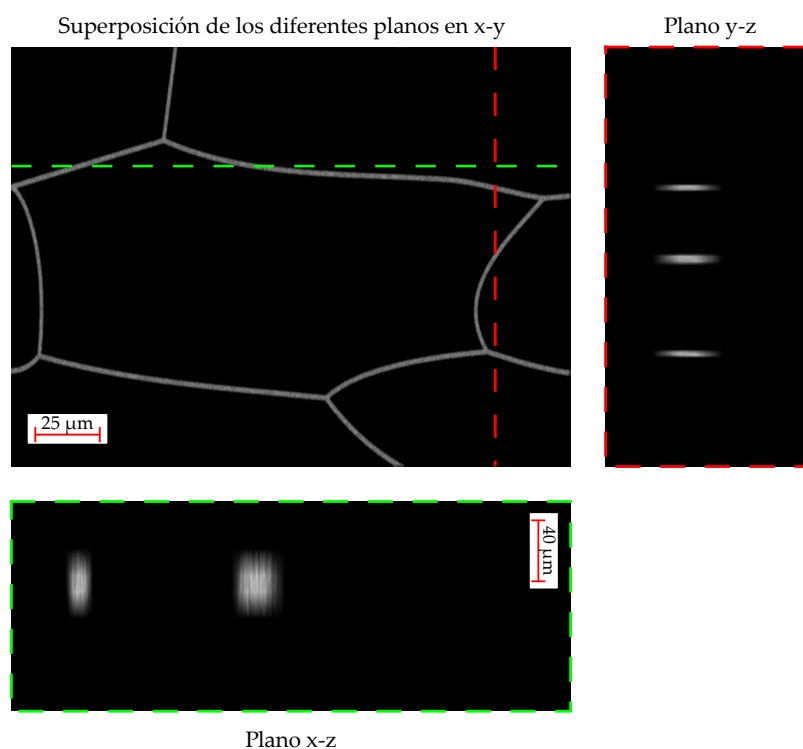


Figura 5-17: Información para diferentes planos de observación obtenida mediante el método de multimicroscopía en la información de retardo del tejido epitelial de cebolla.

El resultado obtenido ejemplifica la utilidad de medir las diferentes propiedades ópticas de los medios, ya que dependiendo de la aplicación, la información que se obtiene puede variar enormemente resaltando algunas características, como es el caso de la imagen de retardo presentada en la Fig. 5-17. Un detalle importante es que la resolución axial de este método no ha sido estudiada en este trabajo, y probablemente se encuentre limitada por la profundidad de foco del sistema.

Referencias

- [1] E. Hecht. *Optics*. Addison Wesley, 1301 Sonsomen St., San Francisco, United States, 4th edition, 2002. [166](#)
- [2] M. Bass and Optical Society of America, editors. *Handbook of optics. Vol. 2: Devices, measurements, and properties*. McGraw-Hill, New York, NY, 2nd. edition, 1995. [166](#)
- [3] S. Jiang, X. Xiong, H. Hu, Y. and Hu, G. Ma, R. Peng, C. Sun, and M. Wang. Controlling the polarization state of light with a dispersion-free metastructure. *Phys. Rev. X*, 4:021026, May 2014. [167](#)
- [4] K. L. Berkowski, K. N. Plunkett, Q. Yu, and J. S. Moore. Introduction to photolithography: Preparation of microscale polymer silhouettes. *Journal of Chemical Education*, **82**(9):1365, 2005. [167](#)
- [5] T.F. Otero and M.T. Cortés. Artificial muscles with tactile sensitivity. *Advanced Materials*, **15**(4):279–282, 2003. [168](#)
- [6] M. W. Williams. Depolarization and cross polarization in ellipsometry of rough surfaces. *Appl. Opt.*, **25**(20):3616–3622, Oct 1986. [169](#)
- [7] H. S. Srivastava, P. Patel, R. R. Navalgund, and Y. Sharma. Retrieval of surface roughness using multi-polarized envisat-1 asar data. *Geocarto International*, **23**(1):67–77, 2008. [169](#)
- [8] A. Baumgartner, S. Dichtl, C. K. Hitzenberger, H. Sattmann, B. Robl, A. Mo-

- ritz, A. F. Fercher, and W. Sperr. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries research*, **34**(1):59–69, 2000. [170](#)
- [9] J. Wu and D. Fried. High contrast near-infrared polarized reflectance images of demineralization on tooth buccal and occlusal surfaces at lambda 1310-nm. *Laser in Surgery and Medicine*, **41**(3):208–213, 2009. [171](#)
- [10] H. Kang, J. J. Jiao, C. Lee, M. H. Le, C. L. Darling, and D. Fried. Nondestructive assessment of early tooth demineralization using cross-polarization optical coherence tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **16**(4):870–876, 2010. [171](#)
- [11] R. S. Jones, C. L. Darling, J. Featherstone, and D. Fried. Remineralization of in vitro dental caries assessed with polarization-sensitive optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, **11**(1):014016, 2006. [171](#)
- [12] M. P. Rowe, J. S. Tyo, N. Engheta, and E. N. Pugh. Polarization-difference imaging: a biologically inspired technique for observation through scattering media. *Optics letters*, 20(6):608–610, 1995. [171](#)
- [13] N. Engheta, E. N. Pugh Jr, and J. Van der Spiegel. Bio-Inspired Sensing and Imaging of Polarization Information in Nature. Technical report, Pennsylvania Univ. Philadelphia Dept. of Electrical and Systems Engineering, 2008. [171](#)
- [14] J. Han, M. Yang, K. and Xia, L. Sun, Z. Cheng, H. Liu, and J. Ye. Resolution enhancement in active underwater polarization imaging with modulation transfer function analysis. *Applied Optics*, **54**(11):3294, April 2015. [171](#)
- [15] D. Suslov, J.-P. Verbelen, and K. Vissenberg. Onion epidermis as a new model to study the control of growth anisotropy in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 60(14):4175–4187, October 2009. [171](#), [182](#)
- [16] C. Shi-Wei, C. Szu-Yu, C. Gia-Wei, T. Tsung-Han, C. Yung-Chih, L. Bai-Ling, and S. Chi-Kuang. Studies of $x(2)/x(3)$ tensors in submicron-scaled bio-tissues

- by polarization harmonics optical microscopy. *Biophysical Journal*, 86(6):3914 – 3922, 2004. [171](#)
- [17] S. K. Nadkarni, M. C. Pierce, B. H. Park, J. F. de Boer, P. Whittaker, B. E. Bouma, J. E. Bressner, E. Halpern, S. L. Houser, and G. J. Tearney. Measurement of collagen and smooth muscle cell content in atherosclerotic plaques using polarization-sensitive optical coherence tomography. *Journal of the American College of Cardiology*, **49**(13):1474–1481, 2007. [171](#)
- [18] A. R. Cortella and M. L. Pochettino. Comparative morphology of starch of three Andean tubers. *Starch-Stärke*, **47**(12):455–461, 1995. [172](#)
- [19] Y Kiselov. Wheat starch granules. Accessed: 2017-10-21. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wheat_starch_granules.JPG. [173](#)
- [20] C. Hopkins. Polarimetric estimation of starch. *Canadian Journal of Research*, **11**(6):751–758, 1934. [174](#)
- [21] J. Ng and B. W. Falk. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **44**:183–212, 2006. [174](#)
- [22] K. Mauck, N. A. Bosque-Pérez, S. D. Eigenbrode, C. M. De Moraes, and M. C. Mescher. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. *Functional Ecology*, **26**(5):1162–1175, October 2012. [174](#)
- [23] K. E. Mauck, C. M. De Moraes, and M.C. Mescher. Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of *Cucurbit mosaic virus* on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors: *Cucurbit mosaic virus* alters host quality and defence status. *Plant, Cell & Environment*, **37**(6):1427–1439, June 2014. [174](#)

- [24] N. W. Roberts, M. L. Porter, and T. W. Cronin. The molecular basis of mechanisms underlying polarization vision. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **366**(1565):627–637, March 2011. [174](#)
- [25] D. J. Maxwell, J. C. Partridge, N. W. Roberts, N. Boonham, and G. D. Foster. The Effects of Plant Virus Infection on Polarization Reflection from Leaves. *PLOS ONE*, **11**(4):e0152836, April 2016. [174](#), [176](#)
- [26] Lois Grant, C. S. T. Daughtry, and V. C. Vanderbilt. Polarized and non-polarized leaf reflectances of *Coleus blumei*. *Environmental and experimental botany*, **27**(2):139–145, 1987. [174](#)
- [27] H. Hanaoka, T. Noda, Y. Shirano, T. Kato, H. Hayashi, D. Shibata, S. Tabata, and Y. Ohsumi. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiology*, **129**(3):1181–1193, 2002. [175](#)
- [28] A. H. Haber and D. E. Foard. Nonessentiality of concurrent cell divisions for degree of polarization of leaf growth. ii. evidence from untreated plants and from chemically induced changes of the degree of polarization. *American Journal of Botany*, **50**(9):937–944, 1963. [176](#)
- [29] J. Chen, H Lin, C. Huang, and Fang C. The relationship between the leaf area index (lai) of rice and the c-band sar vertical/horizontal (vv/hh) polarization ratio. *International Journal of Remote Sensing*, **30**(8):2149–2154, 2009. [176](#)
- [30] J.L Lundberg. Light scattering from large fibers at normal incidence. *Journal of Colloid and Interface Science*, **29**(3):565 – 583, 1969. [178](#)
- [31] Olympus. Applications of polarising microscopy. Accessed: 2017-11-01. <https://www.olympus-lifescience.com/de/microscope-resource/micd/anatomy/micdpolarized/>. [178](#)
- [32] J. Ens and P. Lawrence. Investigation of methods for determining depth from

- focus. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, **15**:97–108, 03 1993. [180](#)
- [33] D. Martisek. The two-dimensional and three-dimensional processing of images provided by conventional microscopes. *Scanning*, **24**(6):284–296, 2002. [180](#)
- [34] M. Niederöst, J. Niederöst, and J. Ščučka. Automatic 3d reconstruction and visualization of microscopic objects from a monoscopic multifocus image sequence. *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, **34**:5, 2003. [180](#)
- [35] C. Chen, W. Shih, P. Chang, H. Lai, S. Chang, P. Huang, and H. Jeng. Onion artificial muscles. *Applied Physics Letters*, **106**(18):183702, May 2015. [182](#)

Capítulo 6

Conclusiones y trabajo futuro

6.1. Respecto a los objetivos específicos

En respuesta a los objetivos específicos que se plantearon en el primer capítulo de este documento, se concluye que se ha desarrollado cada uno de ellos de manera satisfactoria. En primer lugar se tiene la puesta en práctica de los conceptos teóricos asociados a las técnicas de microscopía de luz polarizada, basado en una previa revisión bibliográfica que se plasma en la totalidad del texto mediante el desarrollo de los conceptos teóricos presentados en cada capítulo. Este trabajo ha sido orientado al público genérico, por lo cual se ha buscado explicar las diferentes temáticas de cada capítulo previo a su aplicación. Para la profundización de los conceptos se dejan referencias bibliográficas asociadas a conceptos de polarimetría, diseño de sistemas ópticos y técnicas de microscopía con luz polarizada.

El segundo objetivo relacionado al desarrollo de un modelo computacional se aborda mediante el estudio de la birrefringencia por esfuerzo. En el Capítulo 3 se presenta una aplicación de los conceptos de fotoelasticidad, para mediante procesamiento computacional, determinar como cambiaran las propiedades ópticas de un medio en función de las cargas aplicadas a éste. La aplicación ha demostrado ser funcional, permitiendo predecir los cambios sobre la polarización de la luz que pasa a través del medio bajo efectos de birrefringencia por esfuerzo. El método necesita ser depurado para reducir su error en la medida de sistemas complejos, principalmente en el cálculo

de esfuerzos mediante el método de elementos finitos. Este desarrollo puede ser implementado en labores de diseño o para compensar aberraciones en sistemas ópticos que empleen la polarización de la luz.

El tercer objetivo se aborda a lo largo del documento, partiendo desde el Capítulo 2, en el que se plantea todo el marco teórico asociado a la representación matricial del estado de polarización de la luz y su interacción con medios, donde también se define el concepto de descomposición polar y el procedimiento requerido para su aplicación. En los capítulos siguientes se hace uso de la técnica para obtener las diferentes medidas presentadas. En el Capítulo 3 se utiliza para obtener únicamente los efectos de retardo sobre una ventana óptica, ya que si bien esta no presenta despolarización o dicroísmo, estos pueden presentarse como ruido en las matrices de Mueller. En el Capítulo 4 se utiliza para calcular los cambios introducidos por el microscopio sobre la polarización de la luz. Finalmente, en el Capítulo 5 es abordado, para el estudio de diferentes muestras.

El cuarto objetivo se encuentra desarrollado en el Capítulo 4 asociado al diseño e implementación del microscopio. La aplicación actual de Zemax llamada OpticStudio fue utilizada para modelar el microscopio previo a su montaje, demostrando ser una valiosa herramienta en el diseño de sistemas compuestos, facilitando el cálculo de los caminos de la luz. Además, esta aplicación deja realizar análisis sobre el desempeño del sistema previo a su montaje, lo que permite encontrar errores de diseño previo a la construcción de los sistemas ópticos. Finalmente, al ser un software presenta un registro de los cálculos realizados, que genera un documento donde se conserva la información del sistema implementado, facilitando futuras aplicaciones.

El quinto objetivo también se aborda en el Capítulo 4 donde se presenta la implementación realizada, además de una caracterización del sistema a partir de parámetros como su magnificación, resolución y POTF (Función de transferencia óptica de polarización). También se especifican los elementos utilizados para la elaboración del instrumento, los cuales son analizados mediante el uso de OpticStudio. Siendo explícitos, este objetivo se abordó mediante la construcción de un microscopio que funciona a reflexión y transmisión, permitiendo la observación de muestras y sus propiedades

asociadas a la polarización de la luz, utilizando iluminación monocromática.

Finalmente, una aplicación exploratoria se presentó en el Capítulo 5 en respuesta al último objetivo de este trabajo. Se muestran los resultados de utilizar la técnica de multimonoscopia para la obtención de topografía en muestras biológica, con lo cual se ilustra la capacidad del método para generar imágenes que permitan inferir la forma y distribución espacial de la muestra. El uso de la información polarimétrica ha demostrado su potencial para la segmentación de muestras, ya que como se presentó en el caso de la cebolla, mediante la observación de determinadas propiedades ópticas se pueden resaltar algunas características de las muestras.

6.2. Sobre los resultados obtenidos y las propuestas

Con respecto a los resultados obtenidos, es necesario hacer mención de las medias realizadas mediante el instrumento y su desempeño. En primer lugar, es necesario notar que el dispositivo cumple con su propósito principal al generar una imagen magnificada de las muestras sobre el detector, en conjunto con la posibilidad de realizar medidas polarimétricas mediante la implementación de un sistema PSA-PSG. No obstante, a través del análisis de la MTF se observó que el instrumento se aleja de un sistema limitado por difracción, principalmente debido a aberraciones geométricas dadas por los elementos ópticos utilizados y a condiciones de alineación del montaje, sin embargo, los resultados permiten vislumbrar la aplicabilidad que tiene el sistema completo. Una de las mayores limitaciones asociadas al desarrollo de dispositivos ópticos en el ámbito académico, es el elevado costo de la óptica especializada o por requerimiento (lentes no definidas en catálogos). Si bien el Grupo de Óptica Aplicada de la Universidad EAFIT cuenta con una gran variedad de equipos, la corrección de aberraciones geométricas en sistemas ópticos, no es una tarea fácil de abordar mediante el uso de lentes convencionales.

Con respecto a las medidas se realizaron observaciones sobre muestras no biológi-

cas como: la medida de un polarizador, mediante la cual se corroboró que las medidas asociadas a la polarización que realiza el instrumento fueran correctas, esto se logró al confirmar que la polarizancia y diatenuación del polarizador tienen un valor cercano a uno, correspondiente con la definición de un polarizador ideal. Sin embargo, el polarizador fue la única muestra donde la diatenuación proporcionó información no trivial. La observación de una moneda y un circuito impreso, permitieron ejemplificar el potencial de la técnica para la identificación de materiales. Además, mediante mediciones sobre la moneda, se evidenció la diferencia entre realizar medidas polarimétricas con un microscopio o un sistema formador de imagen convencional. La corta profundidad de campo y foco de los microscopios, asegura que estos forman imagen de un plano muy específico de las muestras. Por otro lado los sistemas ópticos convencionales toman luz de muchos más planos en profundidad, por lo que las propiedades ópticas medidas con estos corresponden a un promedio de las contribuciones realizadas por diferentes regiones del espacio.

Las muestras biológicas igualmente presentaron resultados interesantes. Algunas de las medidas tienen resultados muy directos y fáciles de interpretar, como la identificación de caries en los dientes. Otras aplicaciones requieren un postprocesamiento de las imágenes, por ejemplo: la identificación de las condiciones fisiológicas de las plantas mediante su despolarización, o la medición del espesor de un cabello, éstas dos muestras en particular muestran la funcionalidad de realizar medidas cuantitativas asociadas a las propiedades polarimétricas de los medios. Algunas de las medidas siguen siendo cualitativas, por ejemplo, determinar la presencia de almidón en una muestra, o simplemente realzar bordes como en la medida de la cebolla.

6.3. Trabajo futuro

Como trabajo futuro se propone modificar el sistema para la construcción de un microscopio de coherencia óptica con luz polarizada. Esta propuesta va acorde a los objetivos del grupo de óptica aplicada, ya que permitirá integrar las líneas de OCT y polarimetría en un desarrollo con impacto en las ciencias biológicas, y una

posible aplicación a futuro en las ciencias agrícolas. La implementación requerirá de la integración de un brazo de referencia para la realización de un interferómetro, tal y como se emplea en un sistema OCT de primera generación, donde mediante la adquisición de patrones de interferencia en los diferentes planos de profundidad de la muestra es posible obtener información volumétrica de la muestra.

Además, se considera la posibilidad de obtener algunos instrumentos ópticos adicionales para mejorar el desempeño del sistema. El más crítico sería una lente de tubo, ya que éstas generalmente están diseñadas para tomar la imagen proveniente del objetivo de microscopio, y generar una segunda imagen sin deteriorar de manera representativa el desempeño del sistema. Otro componente que mejoraría las imágenes generadas por el instrumento es una lente condensadora, las cuales suelen estar diseñadas para grandes aperturas numéricas (1,4), por lo cual la resolución del sistema no se vería afectada al cambiar de objetivo.

Una última implementación que se propone es el uso de SLMs en los sistemas de generación y análisis de estados de polarización. Estos elementos pueden cambiar rápidamente sus propiedades ópticas, permitiendo la realización de medidas en tiempo real. Los sistemas diseñados mediante el uso de estos elementos suelen limitarse a la realización de medidas de retardo, no obstante, esto no significa que no puedan ser utilizados para medir otras propiedades ópticas. Es necesario evaluar literatura y considerar la formulación de nuevos modelos para el cálculo de las propiedades ópticas en medios.