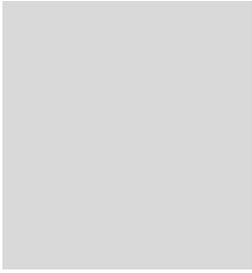


MICROSCOPIO POLARIMÉTRICO SIN LENTES PORTABLE

Maria Josef Lopera Acosta
Proyecto de Grado
Ingeniería Física

Asesor
Carlos Alejandro Trujillo Amaya
Doctor en Física, Profesor asociado de la Universidad EAFIT.

Grupo de Investigación en Óptica Aplicada
Departamento de Física
Escuela de Ciencias
Universidad EAFIT
Medellín, Colombia
2020



AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Carlos Trujillo, por sus buenas ideas, paciencia y motivación.

Al profesor Daniel Velásquez, por sus buenos consejos tanto académicos como personales y por ser un ejemplo a seguir.

A mi familia, madre, hermana y abuelo por su apoyo incondicional.

A mi segunda familia Montoya Zuluaga porque hacen del mundo un lugar más ameno.

Al semillero de Holografía y el grupo de Óptica Aplicada, especialmente a Jose Hernán y Alejandro Madrid, por su amistad, sus enseñanzas y colaboraciones.

A la vida.

Gracias

*Dedicado a Gladys Acosta, por su fe,
resistencia y confianza en la humanidad.*

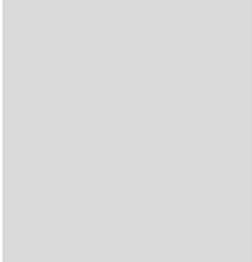


TABLA DE CONTENIDO

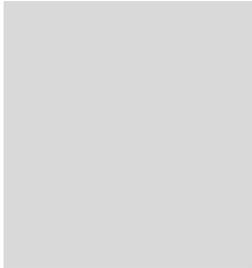
1.	Planteamiento del problema.....	9
1.1.	Objetivos	11
1.1.1.	Objetivo general.....	11
1.1.2.	Objetivos específicos	11
1.2.	Referencias	12
2.	Microscopía.....	13
2.1.	Microscopía óptica	13
2.2.	Microscopía holográfica digital	20
2.3.	Microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM).....	23
2.4.	Referencias	26
3.	Polarimetría.....	28
3.1.	Parámetros de Stokes y cálculo de Jones	33
3.2.	Polarización en medios biológicos	36
3.2.1.	Dicroísmo.....	36
3.2.2.	Birrefringencia.....	37
3.2.3.	Despolarización	38
3.3.	Microscopio polarimétrico.....	39
3.4.	Microscopio sin lentes polarimétrico.....	40
3.5.	Referencias	42
4.	Implementación:.....	43
4.1.	Microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica	43
4.2.	Microscopio polarimétrico sin lentes portable (PPLM).....	50
4.3.	Referencias	60
5.	Conclusiones y Trabajo futuro.....	62
5.1.	Referencias	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de celulares al rededor del mundo según la Unión Internacional de Telecomunicaciones en 2010.	9
Figura 2. (a) Microscopio de campo brillante diseñado por Hooke. (b) Células de corcho ilustradas por Hooke, con estas aparece por primera vez la palabra célula. (c) Ilustración de una pulga por Hooke [4].	13
Figura 3. Células de mucosa bucal vistas en: (a) microscopio de campo brillante, (b) microscopio de campo oscuro, (c) microscopio de contraste de fase Zernike, (d) microscopio holográfico. (e) Fibras de nylon vistas en un microscopio polarimétrico de campo brillante. Imágenes tomadas de [9].	15
Figura 4. Ilustración microscopio compuesto comercial.	16
Figura 5. Trazado de rayos de un microscopio compuesto.	16
Figura 6. Reconstrucción numérica de un holograma digital realizado por J. Goodman. Imagen tomada de [12].	20
Figura 7. Esquema de un montaje de microscopía holográfica digital por transmisión.	21
Figura 8. Ejemplos de reconstrucción cuantitativa de fase de objetos microscópicos, realizado con microscopía holográfica. (a) Células de cebolla. (b) Células epiteliales. (c) Glóbulos rojos. Imágenes tomadas de [9].	22
Figura 9. Representación esquemática de un montaje DLHM.	23
Figura 10. Componentes ortogonales de un campo óptico.	29
Figura 11. Representación gráfica de la elipse de polarización para un tiempo t	30
Figura 12. Representación en el plano x,y de los estados de polarización degenerados LHP, L+45P y RCP.	32
Figura 13. Representación vectorial de Stokes de los estados de polarización degenerados LHP, L+45P y RCP.	34
Figura 14. Representación del funcionamiento de una placa retardadora $\lambda/4$, esta convierte un haz de luz con polarización L±45P a RCP o LCP.	37
Figura 15. Esquema de un microscopio polarimétrico de campo brillante.	39

Figura 16. Esquema de un microscopio sin lentes polarimétrico.	40
Figura 17. Holograma simulado y reconstrucción de los elementos 4 y 5 del grupo 4 de un test de resolución USAF 1951.....	43
Figura 18. (Izquierda) Esquema del montaje óptico microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica y (derecha) fotografía del mismo.....	44
Figura 19. (a) Imagen de un <i>pinhole</i> manufacturado en aluminio, observado a 5000 aumentos en el SEM de la Universidad de Antioquia. (b) Imagen de un <i>pinhole</i> comercial de Newport de $5\mu m$ observado a 3000 aumentos en el SEM de la Universidad EAFIT.....	45
Figura 20. Hologramas y reconstrucciones de los elementos 4 y 5 del grupo 4 de un test de resolución USAF 1951. Los hologramas fueron adquiridos con (a) un sensor CMOS de Thorlabs y (b) la cámara de un Samsung S10 +.	46
Figura 21. Imágenes de intensidad de una muestra con oxalato de calcio adquiridas en un microscopio polarimétrico de campo brillante [8] con (a) los PSG y PSA paralelos y (b) con los PSG y PSA cruzados. (c) Imagen dicroica de la muestra de oxalato de calcio.	47
Figura 22. Hologramas y reconstrucciones de muestra con oxalato de calcio adquiridas en el microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica con (a) los PSG y PSA paralelos y (b) con los PSG y PSA cruzados. (c) Imágenes dicroicas del holograma de la muestra con oxalato de calcio y su reconstrucción.	48
Figura 23. (a) Imagen de campo brillante de una sección de la muestra de papa preparada. (b) Imagen de campo brillante de granos de papa. (c) Imagen polarimétrica de granos de papa (Observadas con un PSG y PSA cruzados). Las imágenes (b) y (c) fueron tomadas de [9].	49
Figura 24. Hologramas y reconstrucciones de la muestra de papa con presencia de granos de almidón adquiridas en el microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica con (a) los PSG y PSA paralelos y (b) con los PSG y PSA cruzados.	49
Figura 25. LED de alta potencia utilizado como fuente de iluminación en el microscopio polarimétrico sin lentes portable y su espectrograma.	50
Figura 26. Simulación del sistema óptico de enfoque realizado en Zemax. (a) Visualización del trazado de rayos. (b) Visualización del haz de salida.....	51
Figura 27. Esquema del montaje óptico del microscopio polarimétrico sin lentes portable.....	52

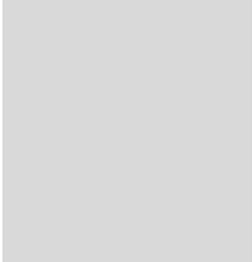
Figura 28. Fotografías del microscopio polarimétrico sin lentes portable de perfil (izquierda) y de frente (derecha) acompañado del celular con el que se adquieren los hologramas.....	56
Figura 29. Hologramas y reconstrucciones de un test USAF. (a) Elementos 4 y 5 del grupo 3 adquiridos utilizando el PPLH y capturados con un sensor CMOS de Thorlabs y (b) elementos 4 y 5 del grupo 4, adquiridos utilizando el PPL y la cámara de un Samsung S10 +.....	56
Figura 30. Imágenes de campo brillante de la antena de un espécimen del orden <i>Hymenoptera</i> capturadas con (a) un microscopio biológico PLEUGER XSZ-107 con objetivo de microscopio 20x y (b) el PPLM.	57
Figura 31. (a) Imagen de campo brillante de una lombriz californiana adquirida con un microscopio biológico PLEUGER XSZ-107 y objetivo de microscopio 5x. (b) Holograma, reconstrucción en fase envuelta y desenvuelta de la muestra adquirido con un DHM [16]. (c) Holograma, reconstrucción en fase envuelta y desenvuelta de la muestra adquirido con el PPLM.	59
Figura 32. Holograma y reconstrucción de la muestra de papa con presencia de granos de almidón adquiridas en el PPLM con el PSA y PSG cruzados.	59



RESUMEN

El correcto y temprano diagnóstico de enfermedades como la malaria disminuye significativamente su tasa de mortalidad, infección y eventualmente esta práctica podría erradicarla [1]. Para realizar un diagnóstico médico es necesario tener técnicos y tecnología adecuados para identificar algún patógeno, sin embargo, ambos requerimientos son difíciles de alcanzar en zonas de escasos recursos [2]. Los microscopios portables han surgido como una propuesta tecnológica que aprovecha la creciente capacidad de los teléfonos móviles y su relativo bajo costo, para mitigar el déficit que hay en ciertos lugares del mundo en tecnología médica y con estos potenciar el diagnóstico de enfermedades [3].

En este trabajo se presenta el estudio, diseño, desarrollo, implementación y validación de un microscopio polarimétrico portable sin lentes utilizado para visualizar y analizar muestras biológicas con comportamientos dicróicos y birrefringentes.



INTRODUCCIÓN

La aparición de la microscopía óptica en Europa alrededor de 1620 fue un hecho que revolucionó la medicina, ya que permitió observar objetos más pequeños de los que anteriormente se podían resolver y con esto entender la biología que hay dentro de cada ser viviente [4]. Desde esta época, se han hecho grandes descubrimientos científicos como el entendimiento del funcionamiento del sistema nervioso y el estudio microscópico de las células y bacterias. Gracias a esto último se ha logrado identificar agentes productores de enfermedades pudiendo diagnosticarlas a tiempo mejorando así la calidad y la expectativa de vida de quienes las padecen.

La microscopía clásica utiliza propiedades ópticas de la luz como la absorción y la refracción para el análisis de las muestras [5]. Sin embargo, se han desarrollado distintas técnicas microscópicas que buscan utilizar todo el campo óptico proveniente de las muestras con el fin de obtener más información de los especímenes bajo estudio. Lo anterior ha llevado al desarrollo de técnicas como la microscopía holográfica, la iluminación de campo oscuro, el microscopio invertido, polarimétrico, entre otros [6]. En el área biomédica las técnicas holográficas y polarimétricas han sido particularmente atractivas en los últimos años debido a que las primeras permiten ver objetos en fase, además de obtener información 3D de las muestras y por otro lado, los efectos polarimétricos de la luz dan cuenta de la naturaleza de los tejidos y proveen información estructural de los mismos [7]. Además de esto, realzan el contraste de las muestras, permitiendo observar efectos que no son comúnmente visibles [8]. Uniendo estas dos técnicas se puede lograr capturar toda la información óptica proveniente de las muestras [9].

Si bien en términos científicos, se han podido solucionar muchos problemas de salud pública, sigue habiendo una gran brecha entre las personas que reciben los beneficios de la ciencia y las que no. La globalización busca llevar cada vez más tecnología a lugares de bajos recursos para incrementar la calidad de vida de las

personas que allí habitan [10]. Una solución que ha llamado la atención de distintos grupos de investigación es la de microscopios portables. Estos dispositivos son más económicos que un microscopio convencional y más fáciles de llevar a estos lugares. Debido a la creciente ola de la inteligencia artificial se ha logrado hacer diagnósticos tempranos de enfermedades letales, como la malaria, sin la necesidad de tener a un experto allí [2][11][12]. Un importante referente en este tema es el Profesor Aydogan Ozcan, quien ha diseñado diferentes prototipos de microscopios portables, que, a partir de lo reportado, son suficientemente eficaces y funcionales para reemplazar los grandes y costosos equipos que utilizan los hospitales estadounidenses [3].

En este documento se expone el proceso llevado a cabo para desarrollar un microscopio polarimétrico sin lentes portable acoplado a un dispositivo móvil. Se parte desde el planteamiento físico y matemático de la microscopía óptica clásica y la microscopía holográfica, fundamentos que permiten establecer una correcta validación del dispositivo portable propuesto. Luego se desarrolla el modelo físico y matemático de la microscopía sin lentes, desarrollo necesario para el entendimiento e implementación de las simulaciones ópticas y las reconstrucciones numéricas de los hologramas. En el capítulo 3 se describen los fundamentos del polarímetro y también los comportamientos polarimétricos esperados en las muestras biológicas. Por último, el Capítulo 4 describe todo el proceso que se realizó en la implementación del dispositivo portable y los resultados obtenidos con este.

1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el 2010 la Unión Internacional de Telecomunicaciones reportó que alrededor de 5 mil millones de personas en el mundo, eran usuarios de teléfonos celulares, un gran porcentaje de esta población (cerca del 70%) hace parte de países en vía de desarrollo. Los celulares son dispositivos que actualmente cuentan con una gran capacidad tanto en hardware como en software y pueden representar numerosas oportunidades para mejorar problemas de salud pública, porque con ellos se pueden desarrollar herramientas para llevar a cabo pruebas médicas y diagnósticas [13].



*Cell phones are now everywhere:
A great potential for Telemedicine needs*

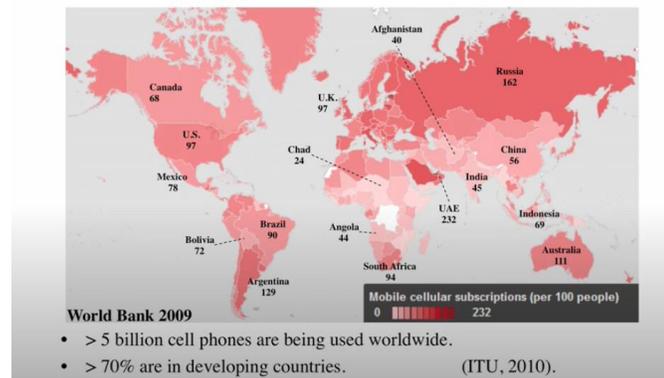


Figura 1. Distribución de celulares al rededor del mundo según la Unión Internacional de Telecomunicaciones en 2010.

La humanidad se ha enfrentado a lo largo de su historia a una gran diversidad de enfermedades letales, gracias al desarrollo científico que comenzó en el siglo XVI y que ahora se complementa con la revolución tecnológica, se ha podido mejorar la

calidad y expectativa de vida del ser humano [2]. Sin embargo, aun enfermedades infecciosas como tuberculosis y malaria causan alrededor de 4 millones de muertes al año, además, si a esto se le suman las muertes relacionadas al contacto con agua no potable las cifras alcanzan a ser 6 millones, según lo reportado por la OMS en 2012 [13].

Teniendo esto en cuenta, las oportunidades que presentan los teléfonos móviles complementados con los instrumentos ópticos que a ellos se les puede acoplar son enormes, especialmente cuando se trata de lugares donde las enfermedades y problemas de salud pública anteriormente mencionados están presentes, porque es allí precisamente donde escasea la tecnología y el personal médico.

Considerando lo anterior y debido a que en el grupo de investigación en Óptica Aplicada de la Universidad EAFIT se desarrolló previamente en el curso Proyecto Avanzado II un microscopio polarimétrico de campo brillante para la detección de malaria [14] se propone desarrollar como proyecto de grado un microscopio polarimétrico sin lentes portable acoplado a un dispositivo móvil que permita capturar las imágenes holográficas en él, además de ser sensible a muestras que presenten efectos polarimétricos.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Desarrollar un microscopio polarimétrico sin lentes portable con el fin de acoplarlo a un dispositivo móvil y obtener imágenes de muestras biológicas.

1.1.2. Objetivos específicos

- Entender los fundamentos de la técnica microscopía holográfica sin lentes (DLHM) para implementar la reconstrucción numérica de sus hologramas.
- Comprender el comportamiento óptico del montaje por medio de una implementación numérica de los algoritmos necesarios en la técnica DLHM involucrando etapas de polarización de la luz para visualizar computacionalmente el comportamiento óptico de las muestras.
- Diseñar e implementar el sistema óptico DLHM polarimétrico en una mesa óptica que permita garantizar los requisitos de desempeño que impone la visualización de las muestras biológicas bajo estudio.
- Adquirir imágenes en el montaje desarrollado en laboratorio, haciendo uso de un sensor CMOS y una cámara de un dispositivo móvil para su posterior procesamiento.
- Diseñar, manufacturar y ensamblar un DLHM portable para acoplarlo en un dispositivo móvil.
- Adquirir y procesar imágenes obtenidas con el acople en el dispositivo móvil para recuperar información de las muestras bajo estudio.
- Comparar los resultados obtenidos con el microscopio polarimétrico portable implementado con aquellos obtenidos en un microscopio polarimétrico de campo brillante con el fin de validar el desempeño del desarrollo.

1.2. Referencias

- [1] “WHO | World Health Organization,” *WHO*, 2019.
- [2] M. Poostchi, K. Silamut, R. J. Maude, S. Jaeger, and G. Thoma, “Image analysis and machine learning for detecting malaria,” *Transl. Res.*, vol. 194, pp. 36–55, 2018.
- [3] “Innovator Under 35: Aydogan Ozcan, 30 - MIT Technology Review.” [Online]. Available: <http://www2.technologyreview.com/tr35/profile.aspx?TRID=808>. [Accessed: 25-Jan-2020].
- [4] M. O. M. O. M. Davison, M, Abramowitz, “Microscopía.” [Online]. Available: <http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/bibliografia.htm>. [Accessed: 30-Sep-2017].
- [5] M. W. Davidson and M. Abramowitz, “Optical Microscopy,” in *Encyclopedia of Imaging Science and Technology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [6] M. Kim K, *Digital Holographic Microscopy, Principles, Techniques, and Applications*, vol. 2. 2012.
- [7] C. Cano, “TESIS DE MAESTRÍA: Diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada para la medición cuantitativa de propiedades polarimétricas en muestras biológicas,” Universidad EAFIT, 2017.
- [8] E. Collett, *Field Guide to Polarization*. 2009.
- [9] I *et al.*, “Phase and Polarization Contrast Methods by Use of Digital Holographic Microscopy: Applications to Different Types of Biological Samples,” *Intech*, vol. i, no. tourism, p. 13, 2012.
- [10] P. M. Tripathi and S. K. Tiwari, “SOCIO-ECONOMIC CHALLENGES OF GLOBALIZATION,” *The Indian Journal of Political Science*, vol. 69. Indian Political Science Association, pp. 717–725.
- [11] W. Bishara *et al.*, “Handheld, lensless microscope identifies malaria parasites.”
- [12] C. W. Pirstill and G. L. Coté, “Malaria Diagnosis Using a Mobile Phone Polarized Microscope,” *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–13, 2015.
- [13] A. Ozcan and TedXBigApple, “TEDxBigApple - Aydogan Ozcan - Microscopy on a Cellphone: An Emerging Telemedicine Platform - YouTube,” 2012. [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=6ewdosy5aOk&t=77s>. [Accessed: 24-Oct-2020].
- [14] M. J. Lopera and C. Trujillo, “Polarimetric Microscope for Malaria Infected Red Blood Cells Analysis .”

MICROSCOPIA

2.1. Microscopía óptica

Un microscopio de campo brillante es una herramienta óptica de formación de imágenes magnificadas que permite observar elementos más pequeños de los que el ojo humano puede resolver [1]. Su resolución se encuentra cercana al tamaño de las células lo cual lo hace ideal para el estudio y entendimiento de organelos y otras estructuras biológicas [2]. Además, debido a que la luz visible no perturba a estas estructuras biológicas, esta técnica permite hacer estudios con células vivas, por periodos de tiempo largos [2].

La historia de los microscopios se remonta al siglo XVI. En 1665 el científico inglés Robert Hooke, el mismo de la ley de elasticidad, presentó su obra “Micrographia”, en donde hizo la descripción de 50 observaciones microscópicas y telescópicas detalladas con ilustraciones [3] [4]. Las observaciones microscópicas las realizó con un microscopio diseñado por él mismo, éste constaba de tres lentes y su diseño se basó en propuestas ya reportadas por Kepler y Galileo [3]. Hooke descubrió las células observando una lámina de corcho en su microscopio, debido a que esta tiene unas cavidades poliédricas similares a las de una celda, las llamo células [5].

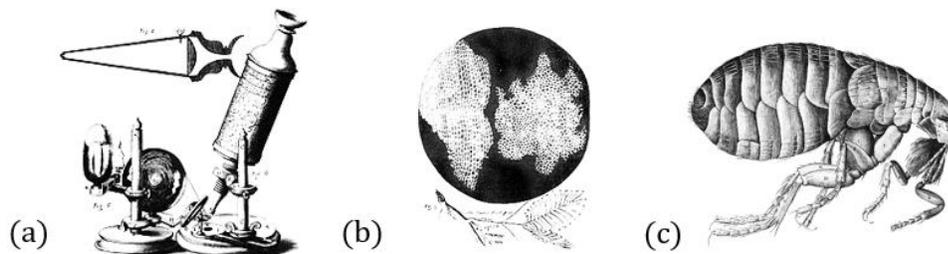


Figura 2. (a) Microscopio de campo brillante diseñado por Hooke. (b) Células de corcho ilustradas por Hooke, con estas aparece por primera vez la palabra célula. (c) Ilustración de una pulga por Hooke [4].

Durante esta época los “microscopistas” lidiaban con aberraciones ópticas, imágenes borrosas y diseños ópticos muy pobres, la calidad de los trabajos y descubrimientos que presentaban dependía más de su experticia que del instrumento en sí.

Antonie van Leeuwenhoek quién fue un comerciante neerlandés, contemporáneo a Hooke, desarrolló también microscopios simples para la visualización de las telas que él comercializaba. Leeuwenhoek manifestó que él “inventó” una metodología para la manufactura de sus lentes, y que con estas logró resoluciones por encima de las presentes en la época. Dado que nunca compartió esta metodología tomó mucho tiempo supéralas. Él junto con el médico Regnier de Graff descubrieron las bacterias y otros numerosos microorganismos como los espermatozoides [6]. Leeuwenhoek lograba magnificaciones hasta de 200 aumentos, con imágenes claras, sin distorsiones y no se observaban grandes evidencias de aberraciones cromáticas, debido a que las dimensiones de sus lentes eran pequeñas (menores a 1 cm de diámetro) [7]. Sin embargo, a pesar de que sus lentes eran las de “mejor” calidad, sus diseños ópticos seguían siendo limitados [7].

No fue sino hasta el siglo XVIII con los avances de la tecnología y la fabricación de lentes que los microscopios cobraron vida, se comenzaron a comercializar y su uso se volvió más popular. En 1886 Carl Zeiss junto con Ernst Abbé desarrollaron objetivos apocromáticos, los cuáles redujeron las aberraciones esféricas y cromáticas y llevaron la resolución de la microscopía a los límites teóricos impuestos por las longitudes de onda de la luz empleada como iluminación de estos sistemas [8]. Posteriormente en 1896 Köhler reportó un método de iluminación que permitió obtener toda la calidad y resolución que los objetivos desarrollados por Abbe proveían.

Desde esta época la microscopía ha sido una herramienta fundamental para el crecimiento y la expansión de investigaciones relacionadas con objetos microscópicos como la caracterización de materiales y el estudio de especímenes biológicos. A su vez, los avances tecnológicos han llevado a que la microscopía óptica en sí haya evolucionado, mejorando las técnicas clásicas de formación de imagen e implementando nuevas. Actualmente se cuenta con una gran variedad de

microscopios, dentro de los más comunes se encuentran los de campo brillante, campo oscuro, de contraste de fase, polarimétricos y holográficos [9].

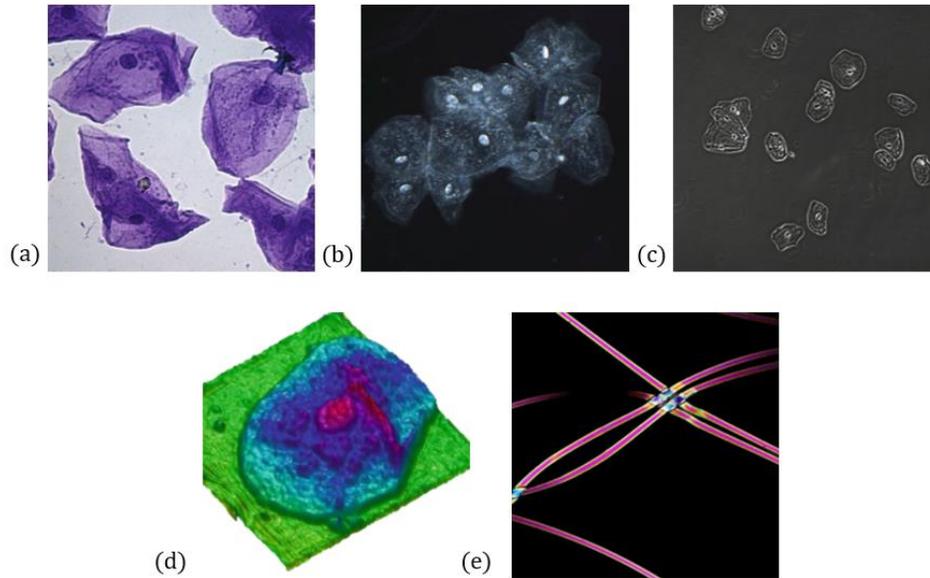


Figura 3. Células de mucosa bucal vistas en: (a) microscopio de campo brillante, (b) microscopio de campo oscuro, (c) microscopio de contraste de fase Zernike, (d) microscopio holográfico. (e) Fibras de nylon vistas en un microscopio polarimétrico de campo brillante. Imágenes tomadas de [9].

De forma general un microscopio compuesto incluye tres elementos esenciales: una fuente de iluminación, la cual usualmente es incoherente y junto a un iluminador de Köhler irradia de forma uniforme la muestra. Un objetivo de microscopio, que es un elemento óptico compuesto por distintos elementos refractivos y se encarga de magnificar el campo óptico de la muestra, este elemento define la resolución del sistema. Por último, un ocular, elemento encargado de llevar la imagen magnificada hasta el observador, bien sea una cámara o el ojo humano.



Figura 4. Ilustración microscopio compuesto comercial.

El modelamiento matemático de la formación de imagen de estos elementos suele hacerse por medio de óptica geométrica. La Figura 5 muestra el trazado de rayos de un microscopio compuesto por los elementos mencionados anteriormente.

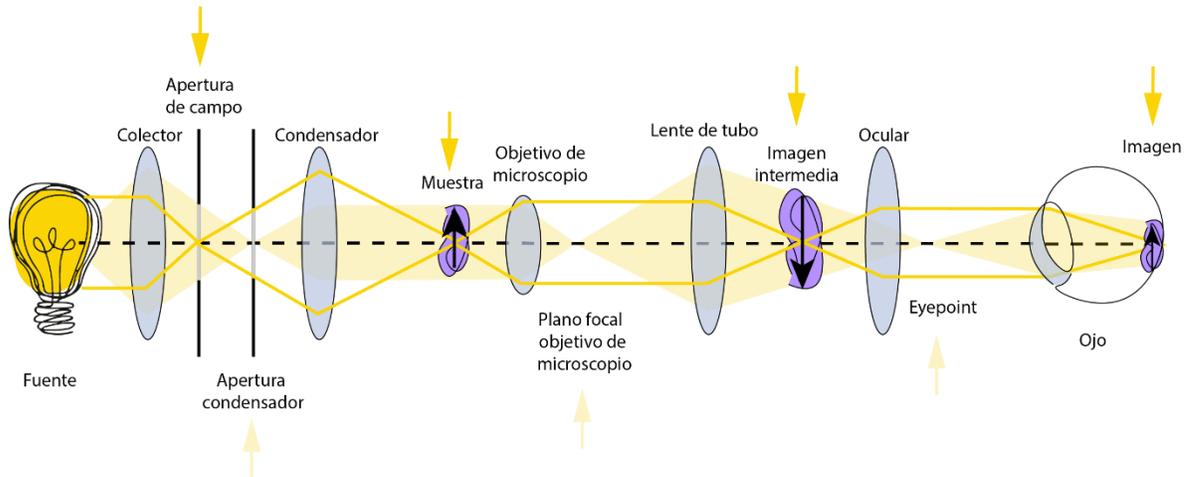


Figura 5. Trazado de rayos de un microscopio compuesto

El iluminador de Köhler se encarga de colimar la fuente extendida de entrada para que a la muestra llegue una iluminación uniforme, lo anterior se logra a través de una lente colectora, que como su nombre lo indica colecta la luz de la fuente, y forma imagen de la lámpara o el filamento en la apertura condensador, la cual controla la intensidad del haz de salida. Como se evidencia en la zona sombreada del trazado

de rayos de la Figura 5. La apertura condensadora está ubicada en un plano conjugado del plano focal del objetivo de microscopio y del “eyepoint” del ocular. Por otro lado, la apertura de campo ubicada después de la lente colectora controla el área de iluminación del haz en la muestra, la cual se encuentra ubicada a la distancia de trabajo del objetivo de microscopio garantizando que la muestra se ubique en la focal efectiva de este y así la imagen de salida esté enfocada. El objetivo de microscopio y la lente de tubo proyectan una imagen real, invertida y magnificada en el plano intermedio del microscopio [1] [9]. Como se puede observar en la línea sólida amarilla de la Figura 5, la apertura de campo, la muestra, la imagen intermedia y la imagen que se proyecta en la cámara se encuentran en planos conjugados.

La focal efectiva del objetivo de microscopio y la de la lente de tubo definen la magnificación del sistema M_o , esta está dada por la relación entre la focal de la lente de tubo f_t y la focal del objetivo de microscopio f_o [9].

$$M_o = \frac{f_t}{f_o} \quad (2.1)$$

Cuando se tiene esta configuración de microscopio compuesto, entre el objetivo de microscopio y la lente de tubo hay una zona donde los rayos de luz son paralelos, esta zona es conocida como “espacio infinito” y es usada para añadir elementos ópticos como polarizadores, placas retardadoras, entre otros, con diseños más simples y logrando menores distorsiones en la imagen [1]. La imagen intermedia es finalmente magnificada por el ocular y llevada hasta la retina del ojo. La magnificación total del sistema está dada por la multiplicación entre la magnificación del objetivo (Objetivo de microscopio + lente de tubo) M_o y la magnificación del ocular M_e [1].

$$M_T = M_o M_e \quad (2.2)$$

En caso de que la imagen no vaya a ser enfocada en la retina del ojo sino en una cámara, el ocular no se hace necesario y la magnificación total del sistema sería M_o .

Si bien la óptica geométrica se ha encargado de encontrar la posición y magnificación de la imagen a partir de trazado de rayos, el entendimiento completo de este sistema requiere hacer un análisis de frecuencias espaciales del mismo, el cual se puede llevar a cabo a partir de la teoría de difracción escalar [10].

Los sistemas ópticos lineales, pueden ser descritos como cajas negras, con una pupila de entrada que limita la información que entra al sistema y una pupila de salida que modifica la amplitud y fase del campo óptico. Para el caso de iluminación coherente, como es el caso que se está considerando, los sistemas ópticos se comportan como sistemas lineales invariantes en amplitud [10].

Para la modelación del microscopio entonces, se asume que el sistema satisface la ecuación de la lente $\frac{1}{z_1} + \frac{1}{z_2} = \frac{1}{f}$ y que tanto el objetivo de microscopio como la lente de tubo hacen parte de un sistema caja negra que tiene una función de respuesta al impulso (PSF por sus siglas en inglés) como la que se presenta en la ecuación (2.3) [10].

$$h(x, y; \xi, \eta) = \frac{1}{\lambda^2 z_1 z_2} e^{j\frac{k}{2z_2}(x^2+y^2)} e^{j\frac{k}{2z_1}(\xi^2+\eta^2)} \iint_{-\infty}^{\infty} P(u, v) e^{-jk(ux+vy)} dudv \quad (2.3)$$

El plano de entrada, ubicado a una distancia z_1 de la pupila tiene coordenadas (x, y) y el plano de salida, ubicado a una distancia z_2 de la pupila tiene coordenadas (ξ, η) . La pupila de este sistema es la función $P(u, v)$ y λ es la longitud de iluminación.

Dada la magnificación total del sistema óptico M_o , entonces se puede predecir la imagen de salida con base en cálculos geométricos, como se estableció anteriormente. La imagen geométrica se obtiene escalando la imagen original como se presenta en la ecuación (2.4) [10].

$$U_{imagen}(\xi, \eta) = \frac{1}{|M_o|} U_{objeto} \left(\frac{x}{M_o}, \frac{y}{M_o} \right) \quad (2.4)$$

El campo óptico en el plano de salida está dado por la convolución entre la imagen encontrada por óptica geométrica (ecuación (2.4)) y la PSF del sistema (ecuación (2.3)).

$$U_{imagen}(\xi, \eta) = \iint_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{|M_o|} U_{objeto} \left(\frac{x}{M_o}, \frac{y}{M_o} \right) h(x - \xi, y - \eta) dx dy \quad (2.5)$$

La ecuación (2.5) representa el patrón de difracción de Fraunhofer de la pupila $P(u, v)$ convolucionado con la función de entrada. Si el sistema está libre de aberraciones, la imagen de salida es simplemente una versión escalada del objeto [10].

La transformada de Fourier de la PSF, es conocida como la función de transferencia de este sistema lineal y es una versión escalada de la pupila.

$$H(f_{\xi}, f_{\eta}) = \mathcal{F}\{h(x - \xi, x - \eta)\} = A \lambda z_2 P(\lambda z_2 f_{\xi}, \lambda z_2 f_{\eta}) \quad (2.6)$$

Para este caso, lo que físicamente limita la entrada de luz al microscopio es la apertura numérica (NA) del objetivo de microscopio, por lo tanto, la pupila es un círculo cuyo radio depende de la apertura numérica. La PSF por lo tanto es la función de Bessel de orden 1, esta demostración puede ser profundizada en la referencia [10]. De acuerdo con lo anterior, la resolución lateral es el radio del primer cero de la función respuesta al impulso h y es inversamente proporcional a esta apertura numérica.

$$\delta x_o = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.7)$$

2.2. Microscopía holográfica digital

La holografía, es una técnica interferométrica propuesta por Denis Gabor en 1948. Gabor la descubrió cuando buscaba mejorar la resolución del microscopio electrónico. Con esta técnica se registra toda la información óptica del campo complejo que es transmitido y/o reflejado por un objeto, haciendo interferir el frente de onda que es esparcido por el objeto y un frente de onda de referencia; clásica o analógicamente este interferograma es grabado en una película fotosensible. Luego del registro y el revelado, al iluminar la película con la onda referencia, el frente de onda de esta se difracta y logra que se recupere toda la información óptica del objeto [11].

La holografía digital, es una técnica de formación de imagen que reemplaza los procesos fotoquímicos presentes en la holografía analógica por una cámara digital y esta técnica permite tener acceso al campo óptico numérico del objeto, pudiendo así recuperar directamente la fase y amplitud del mismo[11] [9].

Unos de los primeros resultados de esta técnica fueron presentados por Joseph Goodman, cuando demostró la viabilidad de desarrollar reconstrucciones completamente numéricas [9] [12].



Figura 6. Reconstrucción numérica de un holograma digital realizado por J. Goodman. Imagen tomada de [12].

La microscopía holográfica digital es entonces una variación de la holografía digital, para este caso se le añade a un sistema de holografía digital un objetivo de

microscopio que magnifica el campo óptico de la muestra. Debido a la capacidad de recuperación de fase, la microscopía holográfica digital resulta ser una técnica que se ha destacado en la biología y la biomedicina debido a que muchos elementos biológicos son translúcidos y bajo esta técnica la información de la muestra se puede recuperar completamente sin el uso de tintes [9].

Un montaje óptico clásico de microscopía holográfica digital consta de una fuente de iluminación coherente, un interferómetro con un objetivo de microscopio en uno de los brazos, para un montaje de transmisión se utiliza normalmente un interferómetro Mach Zehnder y para un montaje de reflexión se utiliza un Michelson. La luz dispersada por el objeto interfiere con el brazo referencia, que es una onda plana [9]. El holograma se digitaliza por medio de una cámara digital y posteriormente se lleva a un computador para hacer la reconstrucción numérica. La Figura 7 muestra un montaje de microscopía holográfica digital por transmisión.

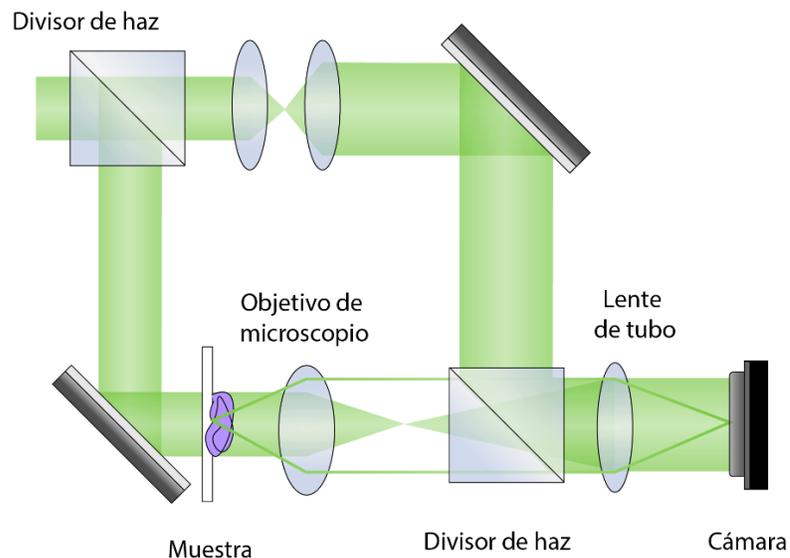


Figura 7. Esquema de un montaje de microscopía holográfica digital por transmisión.

Dado que esta técnica registra toda la información óptica del objeto, esta puede reconstruirse computacionalmente. El caso más sencillo es el de plano imagen, para este caso la configuración del objetivo de microscopio y la lente de tubo deben ser telecéntricas y la reconstrucción numérica del campo óptico solo requiere una etapa

de filtrado espacial que es soportada principalmente a través de una transformada de Fourier. Con el campo óptico se puede obtener la amplitud del objeto y su fase. La posibilidad de recuperar la información de fase de las muestras es una de las características más significativas de la técnica microscopía holográfica digital debido a que permite medir ópticamente espesores con precisiones nanométricas a partir de un solo grabado digital [9].

En la Figura 8 se presentan tres reconstrucciones cuantitativas de fase de objetos microscópicos capturados con un microscopio holográfico digital [[9]].

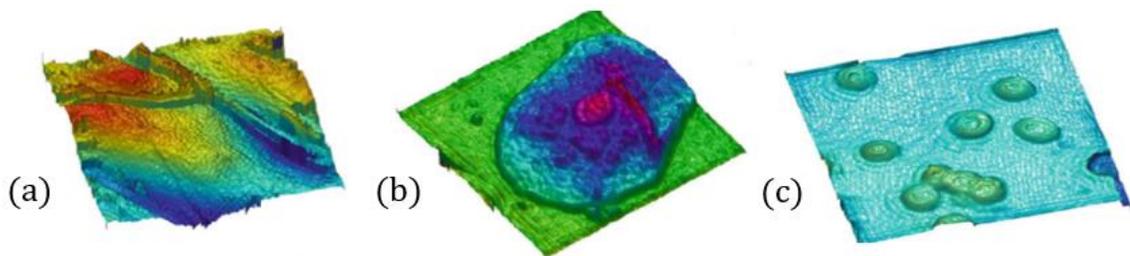


Figura 8. Ejemplos de reconstrucción cuantitativa de fase de objetos microscópicos, realizado con microscopía holográfica. (a) Células de cebolla. (b) Células epiteliales. (c) Glóbulos rojos. Imágenes tomadas de [9].

2.3. Microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM)

En las técnicas estudiadas anteriormente, la formación de imagen de objetos microscópicos y la magnificación de estos se logra gracias a un objetivo de microscopio, sin embargo, en la microscopía digital sin lentes, la magnificación del patrón de difracción se logra por la propagación en el espacio libre de la luz haciendo uso de una iluminación esférica divergente en una configuración en línea [13]. Esta técnica tiene una ventaja frente a las otras técnicas de microscopía y es su capacidad para registrar todo el campo óptico de las muestras empleando solamente un sistema de iluminación y una cámara. Por lo cual esta técnica es ideal para implementaciones compactas.

En la Figura 9 se presenta un esquema de un montaje DLHM. La iluminación esférica divergente se consigue enfocando un haz de luz colimado con una longitud de onda λ en un pinhole cuyo tamaño es del orden de la longitud de onda que se está utilizando. Esta onda esférica incide sobre la muestra, la cual está situada a una distancia z del pinhole, este agujero representa una fuente puntual. El patrón de difracción resultante después de que el frente de onda de iluminación se esparce en la muestra se registra en una cámara digital situada a una distancia L del pinhole. Esta intensidad registrada por la cámara se denomina holograma digital y luego es transferido a un computador para ser procesado, por lo tanto, esta técnica, como cualquier otra técnica holográfica requiere dos pasos.

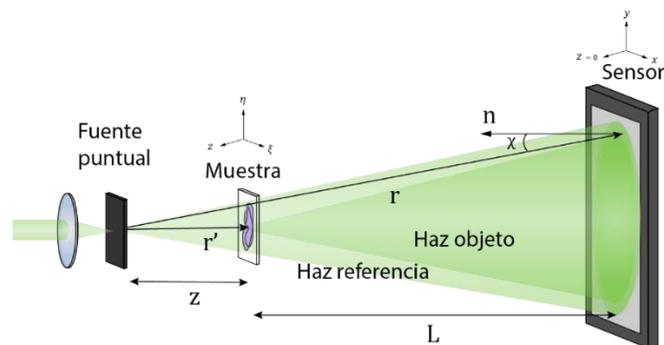


Figura 9. Representación esquemática de un montaje DLHM. El patrón de difracción generado por la presencia de la muestra $U_o(\mathbf{r}')$ en la onda

esférica divergente (de la forma $\frac{e^{ikr'}}{|r'|}$) capturado por la cámara puede ser matemáticamente descrito con la ecuación de difracción de Rayleigh-Sommerfield [10][14].

$$I(\mathbf{r}) = U_i(\mathbf{r})U_i^*(\mathbf{r}) \quad (2.8)$$

$$U_i(\mathbf{r}) = \frac{z}{i\lambda} \int_{muestra} U_o(\mathbf{r}') \frac{e^{ikr'}}{|r'|} \frac{e^{ik(r-r')}}{|r-r'|} d\mathbf{r}'$$

Con el fin de recuperar el campo óptico de la muestra U_o , se debe “decodificar” el patrón de difracción $I(\mathbf{r})$ capturado. Este proceso se realiza propagando a través del holograma digital una onda esférica convergente con características similares a la onda con la cual se capturó el holograma. Se hace uso nuevamente una integral de difracción escalar obteniéndose la expresión (2.9).

$$U_o(\mathbf{r}') = \frac{z}{i\lambda} \int_{sensor} I(\mathbf{r}) \frac{e^{-ikr}}{|r|} \frac{e^{ik(r-r')}}{|r-r'|} d\mathbf{r} \quad (2.9)$$

Esta expresión puede ser reescrita como la integral de difracción de Fresnel-Kirchhoff [10] [15].

$$U_o(\mathbf{r}') = \frac{1}{i2\lambda} \int_{sensor} I(\mathbf{r}) \frac{e^{\frac{i2\pi}{\lambda}|r-r'|}}{|r-r'|} (1 + \cos \chi) d\mathbf{r} \quad (2.10)$$

En esta integral se obtiene un campo óptico de salida $U_o(\mathbf{r}')$ a partir de la propagación de la luz por una rejilla $I(\mathbf{r})$ generada por la difracción del campo óptico de un objeto U_o . El vector $\mathbf{r}' = (\xi, \eta, z)$ define el plano de salida y $\mathbf{r} = (x, y, 0)$ es el plano de entrada. El factor $(1 + \cos \chi)$ se conoce como factor de oblicuidad. Para un mejor entendimiento de estas variables, observar la Figura 9. De la solución de esta integral (ecuación (2.9)) se puede obtener la amplitud y fase de la onda de salida de la siguiente manera,

$$|U_o(\mathbf{r}')| = [Re^2\{U_o(\mathbf{r}')\} + Im^2\{U_o(\mathbf{r}')\}]^{\frac{1}{2}} \quad (2.11)$$

$$\phi(\mathbf{r}') = \tan^{-1} \left[\frac{Im\{U_o(\mathbf{r}')\}}{Re\{U_o(\mathbf{r}')\}} \right] \quad (2.12)$$

Las implementaciones numéricas requeridas para resolver la ecuación de difracción de Fresnel-Kirchhoff, son computacionalmente complejas [10][15]. Para resolverla, lo ideal es buscar aproximaciones o sustituciones que faciliten y reduzcan el costo computacional y que además satisfagan los requerimientos para llevar a cabo la propagación inversa. Para este caso, se necesita que el modelo numérico permita realizar propagaciones en distancias del orden de milímetros, requerimiento que no satisface la aproximación de Fresnel [10]. También se debe tener la capacidad de manipular el tamaño de la ventana de salida, ya que el tamaño de los planos varía según la magnificación que se obtenga a partir del montaje óptico.

Se han propuesto distintas técnicas que satisfacen estos dos requerimientos para llevar a cabo reconstrucción de estos hologramas, una de ellas es la transformada de Fresnel-Bluestein [16]. Por otro lado, se pueden encontrar librerías científicas como JDiffraction [17] y plugins gratuitos como Digital Lensless Holographic Microscopy y Numerical Propagation que tienen implementaciones numéricas de este tipo de propagadores [18][19].

2.4. Referencias

- [1] M. W. Davidson and M. Abramowitz, "Optical Microscopy," in *Encyclopedia of Imaging Science and Technology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [2] K. Thorn, "A quick guide to light microscopy in cell biology," *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 219–222, 2016.
- [3] E. Hecht, *Optics*. Addison-Wesley, 2002.
- [4] R. Hooke, *Micrographia*. [[The Royal Society]], 1665.
- [5] P. Fara, "A microscopic reality tale," *Nature*, vol. 459, no. 7247. pp. 642–644, 04-Jun-2009.
- [6] L. Logan, *Early Microscopes Revealed a New World of Tiny Living Things*. Smithsonian.com, 2016.
- [7] C. Dobell and C. Dobell, *Anthony van Leeuwenhoek and his little animals*. 1932.
- [8] D. Bardell, "The Biologists' Forum: The invention of the microscope," *Bios*, vol. 75, no. 2, pp. 78–84, May 2004.
- [9] M. Kim K, *Digital Holographic Microscopy, Principles, Techniques, and Applications*, vol. 2. 2012.
- [10] J. W. Goodman, "Introduction to Fourier optics." McGraw-Hill, San Francisco, 1968.
- [11] G. Saxby, "Saxby G. Practical holography (IOP, 2004)(ISBN 0750309121)." 2004.
- [12] R. W. L. J. W. Goodman, "Digital image formation from electronically detected holograms.," *Appl. Phys. Lett.*, 1967.
- [13] J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, P. Klages, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy," *Appl. Opt.*, vol. 45, no. 5, pp. 836–850, 2006.
- [14] H. Tobón, C. Trujillo, and J. Garcia-Sucerquia, "Preprocessing in Digital Lensless holographic microscopy for Intensity Reconstructions with Enhanced Contrast," *Appl. Opt.*, 2020.
- [15] P. Piedrahita-Quintero, "Métodos de cuantificación de fase a partir de mediciones de intensidad en microscopía holográfica digital sin lentes," 2018.
- [16] J. Restrepo, J.F. , García Sucerquia, "Magnified reconstruction of digitally recorded holograms by Fesnel-Bluestein transform.," *Appl. Opt.*, vol. 49, 2010.
- [17] P. Piedrahita-Quintero, C. Trujillo, and J. García-Sucerquia, "JDiffraction: A GPGPU-accelerated JAVA library for numerical propagation of scalar wave

- fields,” *Comput. Phys. Commun*, vol. 214, 2017.
- [18] C. Trujillo, P. Piedrahita-Quintero, and J. Garcia-Sucerquia, “Digital lensless holographic microscopy: numerical simulation and reconstruction with ImageJ,” *Appl. Opt.*, vol. 59, no. 19, p. 5788, Jul. 2020.
- [19] P. Piedrahita-Quintero, R. Castañeda, and J. García-Sucerquia, “Numerical Wave Propagation plugin for ImageJ.” [Online]. Available: <http://unaloptodigital.github.io/NumericalPropagation/>.

3

POLARIMETRÍA

La interacción de la luz con un medio se describe matemáticamente gracias a las ecuaciones de Maxwell, estas describen el comportamiento del campo eléctrico y magnético un frente de onda. A partir de ellas se desglosa la ecuación que describe la propagación de las ondas electromagnéticas, como la luz, en un medio [1].

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \epsilon\mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} + \sigma\mu_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (3.1)$$

Como solución a esta ecuación se tiene una onda de la forma,

$$\mathbf{E} = E_0 e^{i(\mathbf{k}\cdot\mathbf{r} - \omega t)} \quad (3.2)$$

Donde $|k| = \frac{2\pi}{\lambda}$ es la magnitud del número de onda, $\omega = 2\pi f$ es la frecuencia angular y E_0 es la amplitud máxima de la onda. El término $\mathbf{k}\cdot\mathbf{r} - \omega t$ es llamado propagador [2].

Alrededor de 1820 y después de Bartholin y Huygens se acercaron a los efectos de la luz en algunos materiales, como el doble índice de refracción de la calcita, Fresnel y Arago demuestran experimentalmente que el campo óptico consiste en dos componentes ortogonales a la dirección de propagación de este [3] [4]. Con base en lo anterior se define la polarización, que es la dirección de oscilación del campo eléctrico de la luz a medida que se propaga en el espacio [1].

Para encontrar un formalismo matemático que describa el comportamiento polarimétrico de un haz de luz, se asume un campo \mathbf{E} que se propaga a través del eje z , por lo tanto, las componentes transversales de este campo óptico vienen dadas por las ecuaciones (3.3) y (3.4).

$$E_x(z, t) = E_{0x} \cos(\omega t - kz + \delta_x) \quad (3.3)$$

$$E_y(z, t) = E_{0y} \cos(\omega t - kz + \delta_y) \quad (3.4)$$

Donde E_{0x} y E_{0y} son amplitudes máximas y δ_x y δ_y las fases iniciales en cada componente. La propagación de estas dos ecuaciones ((3.3) y (3.4)) se puede representar gráficamente como se muestra en la Figura 10 [2] [5]. La componente en el eje y es llamada polarización \mathbf{p} , similarmente la componente en el eje x es llamada polarización \mathbf{s} , estas notaciones provienen de las palabras germanas *parallele* (paralelo) y *senkrecht* (perpendicular) [2].

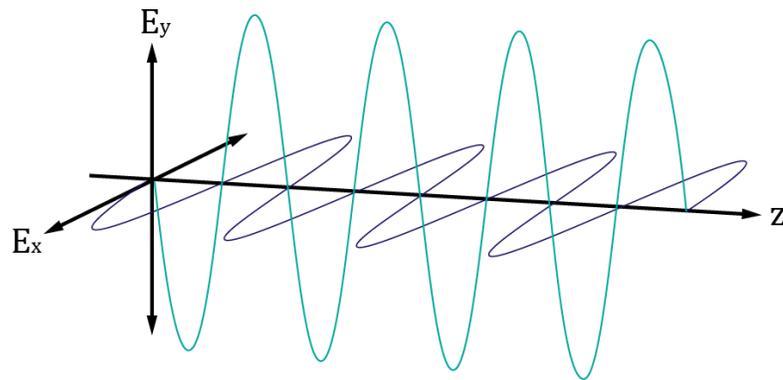


Figura 10. Componentes ortogonales de un campo óptico.

A pesar de que (3.3) y (3.4) describen el comportamiento oscilatorio de la onda, no revelan mucho sobre su polarización. Para desarrollar un mejor análisis, se divide cada ecuación por su componente en amplitud, es decir E_{0x} y E_{0y} y se descompone el *coseno* de cada una utilizando la identidad de suma de ángulo $\cos(\alpha \pm \beta) = \cos(\alpha)\cos(\beta) \mp \sin(\alpha)\sin(\beta)$, con el fin de eliminar el propagador $\omega t - kz$. Después de realizar estas operaciones se obtienen las ecuaciones (3.5) y (3.6).

$$\frac{E_x(z,t)}{E_{0x}} = \cos(\omega t - kz) \cos(\delta_x) - \sin(\omega t - kz) \sin(\delta_x) \quad (3.5)$$

$$\frac{E_y(z,t)}{E_{0y}} = \cos(\omega t - kz) \cos(\delta_y) - \sin(\omega t - kz) \sin(\delta_y) \quad (3.6)$$

Al multiplicar la ecuación (3.5) por $\sin(\delta_y)$ y la ecuación (3.6) por $\sin(\delta_x)$, restar ambas ecuaciones y simplificar la expresión trigonométrica se obtiene la expresión (3.7). De forma similar, se multiplica nuevamente la ecuación (3.5) por el término

$\cos(\delta_y)$ y la ecuación (3.6) por $\cos(\delta_x)$, se restan, se simplifican y se obtiene la expresión (3.8) [6].

$$\frac{E_x(z,t)}{E_{0x}} \text{sen}(\delta_y) - \frac{E_y(z,t)}{E_{0y}} \text{sen}(\delta_x) = \cos(\omega t - kz) \text{sen}(\delta_y - \delta_x) \quad (3.7)$$

$$\frac{E_x(z,t)}{E_{0x}} \cos(\delta_y) - \frac{E_y(z,t)}{E_{0y}} \cos(\delta_x) = \text{sen}(\omega t - kz) \text{sen}(\delta_y - \delta_x) \quad (3.8)$$

Se elevan al cuadrado las ecuaciones (3.7) y (3.8), se suman y se obtiene la ecuación (3.9).

$$\frac{E_x^2}{E_{0x}^2} + \frac{E_y^2}{E_{0y}^2} - 2 \frac{E_x E_y}{E_{0x} E_{0y}} \cos(\delta) = \text{sen}^2(\delta), \quad \delta = \delta_y - \delta_x \quad (3.9)$$

Esta ecuación describe una elipse en su forma no convencional y es conocida elipse de polarización [2].

Se puede observar que el propagador espacio-temporal $\omega t - kz$ quedó explícitamente eliminado de la ecuación, sin embargo, las componentes del campo eléctrico E_x y E_y siguen siendo espacio-temporalmente dependientes. Por lo tanto, la ecuación (3.9) es la distribución del campo eléctrico dado un tiempo y una posición (z, t) .

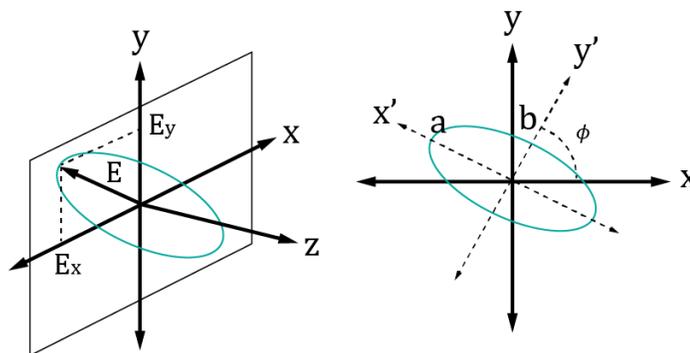


Figura 11. Representación gráfica de la elipse de polarización para un tiempo t .

Si se define un ángulo de rotación con respecto al eje x, de forma tal que el eje menor de la elipse esté alineado con el eje horizontal de un nuevo sistema de coordenadas (x', y') se obtiene una expresión matemática más simple de la elipse de polarización.

$$\left(\frac{E'_x}{a}\right)^2 + \left(\frac{E'_y}{b}\right)^2 = 1 \quad (3.10)$$

De forma general un campo óptico presenta polarización elíptica, sin embargo, hay casos particulares de esta elipse que deben considerarse. Estos casos son llamados estados de polarización degenerados [2] y se resumen en las siguientes tres condiciones:

- $E_{0x} = 0 \vee E_{0y} = 0$

Para este caso, si la amplitud en uno de los ejes es cero, el campo óptico no tiene componente en este eje, por lo que el campo óptico solamente será descrito por una oscilación en uno de los ejes. Si $E_{0x} = 0$ el campo óptico solamente es descrito por la componente E_y descrita en la ecuación (3.4) y en este caso se dice que el campo óptico tiene polarización lineal vertical (LVP por sus siglas en inglés), en el caso contrario la polarización del campo óptico se conoce como polarización lineal horizontal (LHP por sus siglas en inglés)

- $\delta = 0 \vee \delta = n\pi, \quad n \in \mathcal{N}$

Para este caso, al reemplazar en valor de δ en la ecuación de la elipse (3.9) se obtiene,

$$\frac{E_x^2}{E_{0x}^2} + \frac{E_y^2}{E_{0y}^2} \pm 2 \frac{E_x E_y}{E_{0x} E_{0y}} = 0 \quad (3.11)$$

Al factorizar y despejar una de las componentes, en este caso E_y se obtiene la ecuación de una línea recta con pendiente $\pm \frac{E_{0y}}{E_{0x}}$ e intercepto en 0.

$$\left(\frac{E_x}{E_{0x}} \pm \frac{E_y}{E_{0y}}\right)^2 = 0 \rightarrow E_y = \pm \frac{E_{0y}}{E_{0x}} E_x \quad (3.12)$$

En este caso se tiene un campo óptico linealmente polarizado con un ángulo igual a $\tan^{-1}\left(\pm \frac{E_{0y}}{E_{0x}}\right)$ rad.

Cuando $E_{0y} = E_{0x}$ se tiene el caso de luz linealmente polarizada a $+45^\circ$ (L+45P por sus siglas en inglés).

- $E_{0x} = E_{0y} = E_0 \wedge \delta = \frac{(2n-1)\pi}{2}, n \in \mathbf{E}$

Para este último caso, al reemplazar los valores de la condición, la ecuación de la elipse (3.9) se reduce a la ecuación de un círculo. Este caso se conoce como polarización circular, es circular derecha si $\delta = \frac{\pi}{2}$ (RCP) y es izquierda si $\delta = -\frac{\pi}{2}$. (LCP)

$$\frac{E_x^2}{E_0^2} + \frac{E_y^2}{E_0^2} = 1 \quad (3.13)$$

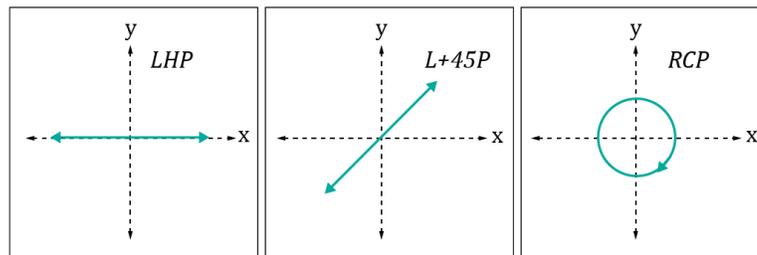


Figura 12. Representación en el plano x, y de los estados de polarización degenerados LHP, L+45P y RCP.

3.1. Parámetros de Stokes y cálculo de Jones

A través de la elipse de polarización es posible describir matemáticamente cualquier estado de polarización de un campo óptico completamente polarizado, es decir cuya oscilación es constante en una configuración específica. Sin embargo, este formalismo es poco práctico a la hora de calcular numéricamente distintos efectos. Algunos de ellos son la interacción de luz polarizada con un medio [2][6] o el cálculo de estados de polarización aleatorios. Los campos ópticos que no tienen un estado de polarización definido se le denominan parcialmente polarizados y se encuentran comúnmente cuando luz no polarizada es reflejada por una superficie [1].

Una forma alternativa para representar un campo óptico parcial o completamente polarizado fue introducida por Stokes alrededor de 1852 [4]. Este formalismo se desarrolla calculando el promedio temporal de la ecuación (3.9)¹. Al realizar este cálculo se obtiene la siguiente expresión

$$S_0^2 = S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 \quad (3.14)$$

De la ecuación (3.14) las cantidades S_0, S_1, S_2, S_3 son los observables del campo óptico. Estos observables son llamados los parámetros de polarización de Stokes o simplemente parámetros de Stokes.

$$\begin{aligned} S_0 &= E_{0x}^2 + E_{0y}^2 \\ S_1 &= E_{0x}^2 - E_{0y}^2 \\ S_2 &= 2E_{0x}E_{0y}\cos\delta \\ S_3 &= 2E_{0x}E_{0y}\sin\delta \end{aligned} \quad (3.15)$$

Con estos parámetros es posible construir un vector, llamado vector de Stokes y con este vector describir completamente la polarización de un campo óptico.

¹ Ir a [2] y [6] para más detalles sobre este cálculo.

$$S = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} \quad (3.16)$$

En la Figura 13 se muestran algunos vectores de Stokes para los estados de polarización degenerados.

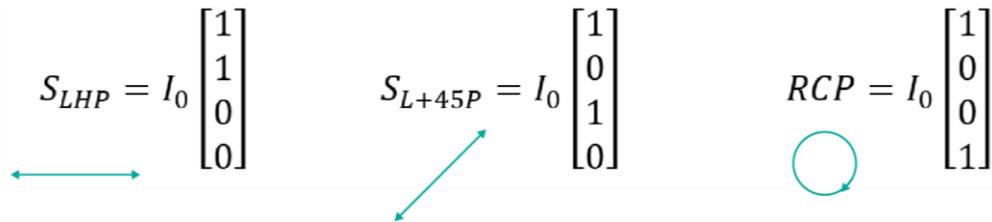


Figura 13. Representación vectorial de Stokes de los estados de polarización degenerados LHP, L+45P y RCP.

Con los parámetros de Stokes se puede obtener fácilmente cuatro cantidades que facilitan el entendimiento de la polarización del campo óptico. La primera es la intensidad total del haz óptico (I), la segunda es el grado de polarización (DOP) esta es la medida que cuantifica el porcentaje de luz que cuenta con polarización estable, bien sea que el campo oscile en una sola dirección (polarización lineal) o que constantemente los campos giren en un plano (polarización circular o elíptica). Por último se puede calcular también el grado de polarización lineal ($DOLP$) y grado de polarización circular ($DOCP$) [2] que estas son las medidas que cuantifican qué porcentaje del campo óptico tiene polarización lineal y/o polarización circular. Las expresiones para obtener estos cálculos se muestran en las ecuaciones (3.17).

$$\begin{aligned}
 I &= S_0 \\
 DOP &= \frac{\sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}}{S_0} \\
 DOLP &= \frac{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}}{S_0} \\
 DOCP &= \frac{S_3}{S_0}
 \end{aligned} \quad (3.17)$$

Otra metodología relevante para el tratamiento matemático de la polarización de la luz es aquel propuesto por Jones en 1941, y es una formulación matricial para el estado de polarización y la interacción de un haz polarizado con un medio [1].

En este formalismo, un estado de polarización se representa a partir de un vector de 2×1 elementos, los cuales son las componentes x y y del campo óptico, llamado vector de Jones. Un medio con propiedades polarizadoras se representa con una matriz de 2×2 elementos y se denomina matriz de Jones [2][6]. Esta formulación solamente es válida para luz totalmente polarizada, por lo cual debe ser usado en problemas donde se traten campos ópticos y no la intensidad de estos.

Para un campo E el vector de Jones se constituye de las componentes del campo E_x y E_y .

$$\mathbf{E} = \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \end{bmatrix} = e^{i(kz - \omega t)} \begin{bmatrix} E_{0x} e^{i\delta_x} \\ E_{0y} e^{i\delta_y} \end{bmatrix} \quad (3.18)$$

Como ejemplo de este formalismo, en la expresión (3.19) se presentan los vectores de Jones de los estados degenerados LHP, L+45P y RCP.

$$E_{LHP} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} \quad E_{L+45P} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} \quad E_{RCP} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix} \quad (3.19)$$

Dado un campo óptico polarizado de entrada E_i que pasa a través de un medio polarizador J se puede conocer la polarización del campo óptico de salida E_o por medio de una multiplicación matricial como se presenta en la expresión (3.20),

$$\mathbf{E}_o = \mathbf{J} \cdot \mathbf{E}_i = \begin{bmatrix} J_{00} & J_{01} \\ J_{10} & J_{11} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_{xi} \\ E_{yi} \end{bmatrix} \quad (3.20)$$

3.2. Polarización en medios biológicos

Se ha descrito hasta la sección anterior la representación de haces de luz polarizados. En esta sección, se busca establecer qué sucede cuando la luz polarizada interactúa con una muestra, particularmente muestras que se componen por especímenes biológicos.

La polarimetría ha sido un área de importante investigación principalmente en el estudio de materiales, pero en las últimas décadas ha sido ampliamente usado en biología, ya que los tejidos biológicos presentan estructuras con propiedades polarimétricas debido a ciertos factores como las fibras, la distribución molecular y las estructuras proteínicas [7] [8]. Estas propiedades de los medios pueden agruparse en tres casos: la propiedad de polarizar la luz (aumentar el grado de polarización DOP), de despolarizarla (disminuir el grado de polarización DOP) y la de inducir cambios en el estado de polarización. A continuación, se detallan estos tres casos [6][2].

3.2.1. Dicroísmo

También conocido como diatenuación, es la capacidad de un medio de presentar distintas transmitancias en función del estado de polarización de la luz que le incide [2]. Un material idealmente dicroico, presenta una transmitancia de intensidad máxima para un estado de polarización dado y una transmitancia de intensidad igual a cero para el estado de polarización ortogonal. También es común encontrar esta propiedad en porcentajes, es decir, solo un porcentaje del campo óptico presenta una transmitancia máxima para un estado de polarización y una mínima para su estado ortogonal.

La cuantificación del dicroísmo se hace mediante la siguiente expresión,

$$D(\lambda) = \frac{I_{max}(\lambda) - I_{min}(\lambda)}{I_{max}(\lambda) + I_{min}(\lambda)} \quad (3.21)$$

3.2.2. Birrefringencia

De forma general esta propiedad se conoce como retardo lineal, y es la capacidad de un medio de generar una diferencia de fase entre dos estados de polarización ortogonales [1] [2] [6], lo cual se debe a que presentan distintos índices de refracción a lo largo del material para cada una de las componentes ortogonales del campo eléctrico que se transmite a lo largo del mismo. La diferencia de fase hace que una de las componentes del campo óptico presente un retraso respecto a la otra y es por esto por lo que esta propiedad recibe el nombre de retardo [2]. Comúnmente se caracterizan los medios birrefringentes por la diferencia entre los mencionados índices de refracción

$$\Delta n(\lambda) = |n_1(\lambda) - n_2(\lambda)| \quad (3.22)$$

En la práctica, los retardadores son utilizados para cambiar el estado de polarización de un haz de entrada. Los ejemplos más comunes son las placas retardadoras o placas de onda (*wave plates*). La placa $\lambda/4$ es un elemento óptico que induce una diferencia de fase relativa de $\pi/2$ entre las componentes del campo eléctrico. Cuando un campo óptico que tiene polarización de $\pm 45^\circ$ (L ± 45 P) pasa por esta placa, las componentes del campo eléctrico tienen igual amplitud, y bajo esta circunstancia el haz pasa a estar polarizado circularmente [1]. Similarmente, si el haz incidente tiene polarización circular, al pasar por el retardador sale con polarización lineal a $\pm 45^\circ$ (L+45P o L-45P). Normalmente estas placas están hechas de cuarzo, mica o polímeros [1].

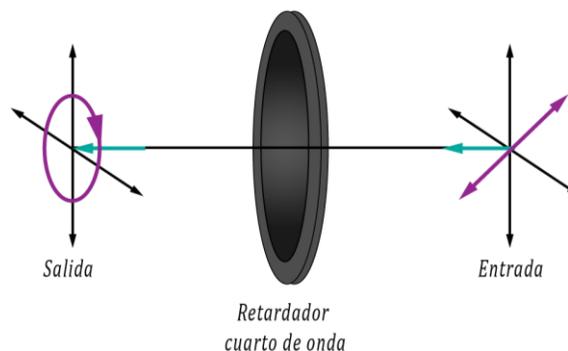


Figura 14. Representación del funcionamiento de una placa retardadora $\lambda/4$, esta convierte un haz de luz con polarización L ± 45 P a RCP o LCP.

3.2.3. Despolarización

Si un haz de luz 100% polarizado incide sobre una muestra y a la salida del medio, el grado de polarización del haz ha disminuido se dice que el medio posee propiedades de despolarización. Como su nombre lo indica, es la capacidad de convertir un haz polarizado en uno no polarizado; la despolarización puede ser parcial o total. Esta propiedad está presente cuando hay esparcimiento de fotones en orientaciones aleatorias a lo largo de la propagación del haz lumínico a través del medio [2][3]. También puede presentarse el caso contrario, donde luz no polarizada al pasar por un medio se polarice, a esta capacidad se le llama polarizancia y se mide con el grado de polarización (DOP).

Un ejemplo de esta propiedad son los polarizadores, los cuales convierten un haz de luz no polarizado en uno con alguna forma de polarización [1]. Los polarizadores cuentan con propiedades asimétricas que permiten “seleccionar” un estado de polarización particular del haz de entrada y descartar las demás [1].

3.3. Microscopio polarimétrico

Para cuantificar los observables vistos anteriormente y determinar las propiedades polarimétricas de la luz y de los medios, es necesario implementar un montaje óptico llamado *polarímetro* [6].

Se han desarrollado distintas configuraciones de polarímetros, pero la más común consiste en un generador de estados de polarización (PSG por sus siglas en inglés), un analizador de estados de polarización (PSA por sus siglas en inglés), ambos, tanto el generador como el analizador son dispositivos capaces de crear todos los estados de polarización degenerados (LHP, LVP, L+45P, L-45P, RCP; LCP). Estos sistemas ópticos se conforman usualmente de un polarizador lineal seguido de una placa retardadora $\lambda/4$.

Para una configuración por transmisión, se ubica una muestra entre el PSG y el PSA. Cuando el análisis que se desea hacer es en muestras micrométricas, se coloca un sistema magnificador telecéntrico (Objetivo de microscopio y lente de tubo) como el que se estudió en el *Capítulo 2 : Microscopía*, para magnificar el campo óptico de la muestra. El esquema de un montaje óptico de un microscopio polarimétrico de campo brillante se muestra en la Figura 15.

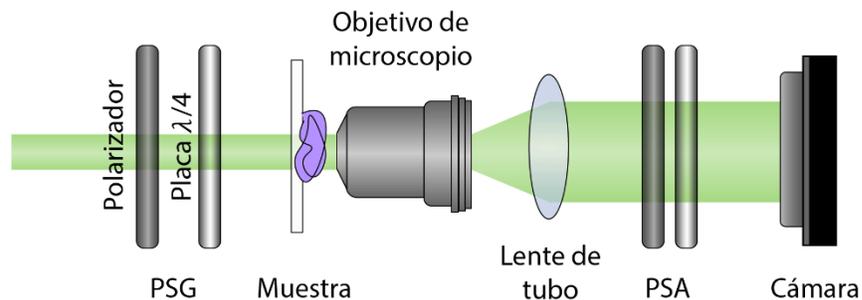


Figura 15. Esquema de un microscopio polarimétrico de campo brillante.

Si únicamente se quieren evaluar las propiedades polarimétricas lineales de la muestra, no se hace necesario tener la placa $\lambda/4$ y tanto el PSG como el PSA constan únicamente de polarizadores lineales.

3.4. Microscopio sin lentes polarimétrico

En el *Capítulo 2: Microscopía*, se presentó la microscopía sin lentes como una alternativa adecuada para el desarrollo de un microscopio portable, ya que sus dimensiones son considerablemente más pequeñas que las de un microscopio óptico compuesto tradicional, y, al ser una técnica holográfica, permite capturar la fase de las muestras y reconstruir tridimensionalmente objetos. Además de todas estas ventajas, al sistema DLHM se le puede añadir un polarímetro lineal para hacer análisis polarimétricos [9] .

El montaje óptico de este sistema es el clásico de microscopía sin lentes [10] con dos polarizadores lineales, uno antes de la muestra y otro después de esta, cercano al sensor. Si se desean estudiar propiedades polarimétricas circulares, se hace necesario añadir una placa retardadora $\lambda/4$ en el PSG y otra en el PSA.

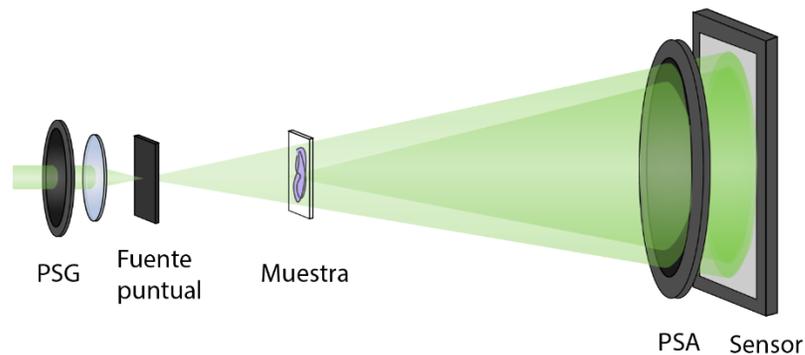


Figura 16. Esquema de un microscopio sin lentes polarimétrico.

En esta configuración es pertinente asegurar que el filtrado espacial realizado por la lente y el *pinhole* no afecta el estado de polarización inducido por el PSG. Para demostrar lo anterior, se considera un campo óptico de entrada \mathbf{E}_{input} , este es una onda plana como se observa en Figura 16, aquí se asume que las componentes del vector de Jones también son ondas planas.

$$\mathbf{E}_{input} = e^{ikz} \begin{bmatrix} \mathbf{E}_{0x} \\ \mathbf{E}_{0y} \end{bmatrix} \quad (3.23)$$

Las lentes delgadas tienen la capacidad de ejecutar ópticamente transformadas de Fourier [11], por lo tanto, a la distancia focal de la lente se obtiene la transformada de Fourier de la onda plana de entrada. En este mismo plano se encuentra ubicado el pinhole cuyo diámetro es 2ρ , y tiene como función hacer un filtrado espacial e inducir coherencia espacial a la onda de salida. Dicho esto, en el plano de Fourier de la lente, se tiene el campo óptico presentado en la ecuación (3.24), lo cual es una representación matemática de una fuente puntual generada por las condiciones antes mencionadas.

$$\mathbf{E}_{focal} = \begin{bmatrix} E_{focal\xi} \\ E_{focal\eta} \end{bmatrix} = e^{ikz} \text{circ} \left(\frac{\xi^2 + \eta^2}{\rho} \right) \begin{bmatrix} \mathcal{F}\mathcal{T}_{x\xi} \{ \mathbf{E}_{0x} \} \\ \mathcal{F}\mathcal{T}_{y\eta} \{ \mathbf{E}_{0y} \} \end{bmatrix} = e^{ikz} \text{circ} \left(\frac{\xi^2 + \eta^2}{\rho} \right) \begin{bmatrix} E_{0\xi} \delta(\xi) \\ E_{0\eta} \delta(\eta) \end{bmatrix} \quad (3.24)$$

Para encontrar la expresión matemática del campo óptico después del *pinhole*, que es donde se desea conocer el estado de polarización, se utiliza como formalismo de propagación la transformada de Fresnel sobre el campo óptico \mathbf{E}_{focal} , obteniendo la siguiente expresión,

$$\mathbf{E}_{out} = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} \begin{bmatrix} \int_{-\infty}^{\infty} E_{focal\xi} e^{\frac{ik(\xi-x)^2}{2z}} d\xi \\ \int_{-\infty}^{\infty} E_{focal\eta} e^{\frac{ik(\eta-y)^2}{2z}} d\eta \end{bmatrix} = \frac{e^{2ikz}}{i\lambda z} \frac{\rho}{(x^2 + y^2)} J_1(2\pi\rho(x^2 + y^2)) \begin{bmatrix} \mathbf{E}_{0x} \\ \mathbf{E}_{0y} \end{bmatrix} \quad (3.25)$$

Como era de esperarse, después del *pinhole* se tiene una onda esférica que se propaga a través del eje z, y cuya esfericidad depende de la apertura del pinhole. También es claro que esta onda esférica tiene la misma distribución en las componentes de polarización que el haz de entrada, con un vector de Jones de salida igual al de entrada $\begin{bmatrix} \mathbf{E}_{0x} \\ \mathbf{E}_{0y} \end{bmatrix}$, demostrando así que el filtrado espacial no afecta las condiciones polarimétricas de la luz.

3.5. Referencias

- [1] E. Hecht, *Optics*. Addison-Wesley, 2002.
- [2] E. Collett, *Field Guide to Polarization*. 2009.
- [3] Leica Microsystems Inc, "La Polarización la de luz," 2000. [Online]. Available: www.leica-microsystems.com. [Accessed: 03-Oct-2020].
- [4] D. Goldstein, "Polarized Light," 2003.
- [5] W. A. (Harvard U. Shurkliff, *Polarized Light, Production and Use*. Massachussets., 1962.
- [6] C. Cano, "TESIS DE MAESTRÍA: Diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada para la medición cuantitativa de propiedades polarimétricas en muestras biológicas," Universidad EAFIT, 2017.
- [7] V. V. Tuchin, "Polarized light interaction with tissues," *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 7, p. 071114, 2016.
- [8] I *et al.*, "Phase and Polarization Contrast Methods by Use of Digital Holographic Microscopy: Applications to Different Types of Biological Samples," *Intech*, vol. i, no. tourism, p. 13, 2012.
- [9] C. Oh, S. Isikman, and A. Ozcan, "Lensfree polarization microscopy on a chip using incoherent digital holography," *Opt. InfoBase Conf. Pap.*, vol. 1, pp. 4–5, 2010.
- [10] H. K. V Lotsch *et al.*, *Digital Holographic Microscopy*. 2009.
- [11] J. W. Goodman, "Introduction to Fourier optics." McGraw-Hill, San Francisco, 1968.

IMPLEMENTACIÓN: MICROSCOPIO POLARIMÉTRICO SIN LENTES PORTABLE

4.1. Microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica

El primer acercamiento al microscopio polarimétrico sin lentes portable (PPLM *Portable Polarimetric Lensfree Microscope*) se hizo a través de simulaciones computacionales del mismo. Para esto se empleó un algoritmo de propagación de una onda esférica que hace uso de la transformada Fresnel-Bluestein [1] a este algoritmo se le añadió una fase para el modelamiento de la de polarización que utiliza el formalismo de Jones estudiado en el *Capítulo 3*. A continuación, en la Figura 17 se presenta un holograma DLHM simulado y su reconstrucción en campo brillante de los elementos 4 y 5 del grupo 4 de un test de resolución USAF.

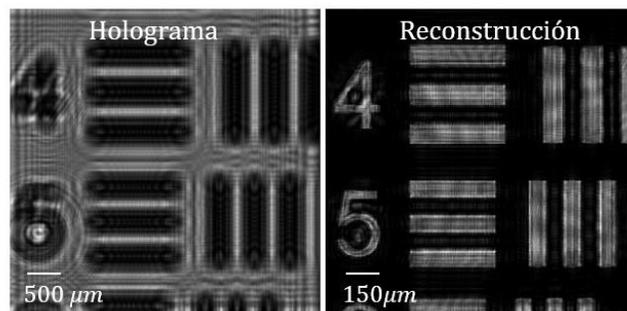


Figura 17. Holograma simulado y reconstrucción de los elementos 4 y 5 del grupo 4 de un test de resolución USAF 1951.

Posterior a las simulaciones ópticas, se diseñó e implementó un montaje de microscopía sin lentes [2](Figura 16) en una mesa óptica. La fuente de iluminación utilizada es un láser diodo Cobolt de 532 nm que cuenta con potencia variable entre 1 mW y 200 mW . En este montaje se utilizó una potencia de 20 mW . La onda esférica divergente, propia del sistema DLHM, se genera enfocando el haz colimado que sale del láser con un objetivo de microscopio $20\times$ de Newport. A 1.7 mm de la salida del objetivo de microscopio (a su distancia de trabajo [3]) se ubica un *pinhole*. Estos dos elementos se utilizan comúnmente para realizar filtrado espacial óptico. El montaje descrito se muestra en la Figura 18.

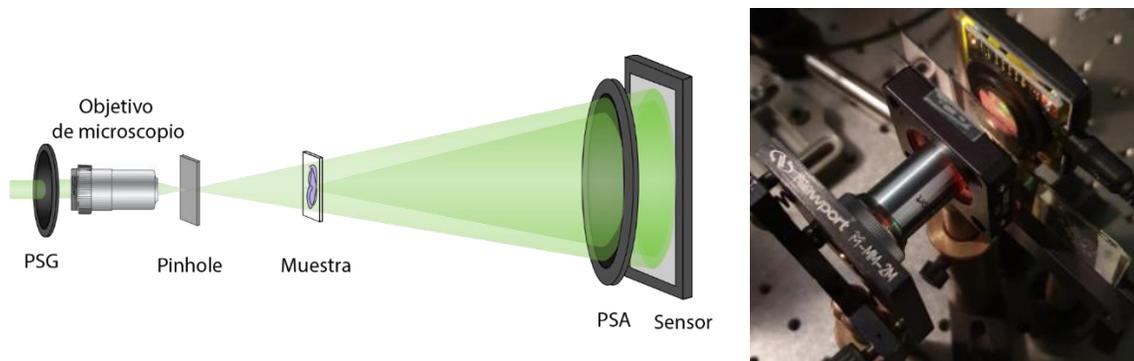


Figura 18. (Izquierda) Esquema del montaje óptico microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica y (derecha) fotografía del mismo.

El *pinhole*, es un pequeño agujero cuyo tamaño es del orden de la longitud de onda con la que se está trabajando [4], para este caso, el tamaño debe ser de unos micrómetros (Entre $0.1\ \mu\text{m}$ y $10\ \mu\text{m}$). En el laboratorio de Óptica Aplicada de la universidad EAFIT se dispone de diversos *pinholes* hechos en molibdeno con monturas roscadas y de acero de la marca Newport, su precio es de alrededor de $\$150\text{ USD}$ [5]. Las monturas en las que están ensamblados los *pinholes* son ideales para hacer filtrado espacial, pero para un montaje DLHM, donde se necesita que la muestra se ubique muy cercana a la fuente puntual, estas monturas son un inconveniente. Teniendo en cuenta la dificultad de remover los *pinholes* de su montura, además del riesgo de dañarlos, se optó por construir estos elementos manualmente. Para ello, se cortaron unas láminas de papel aluminio y delicadamente con una aguja textil de punta fina, se perforó el aluminio. Con esta técnica se lograron obtener *pinholes* de diámetros entre $5\ \mu\text{m}$ y $15\ \mu\text{m}$. En la Figura 19 (a) se muestra una imagen adquirida con un microscopio electrónico de barrido

SEM de la Universidad de Antioquia, medida tomada gracias a la profesora Claudia Palacio de la Universidad EAFIT, de un *pinhole* manufacturado en papel aluminio. A pesar de que este no es perfectamente circular, su forma y tamaño son comparables con los de un *pinhole* comercial de Newport de $5\mu m$, cuya imagen SEM adquirida en la Universidad EAFIT se muestra en la Figura 19 (b), a pesar de que los aumentos y las resoluciones de las imágenes no son las mismas, se puede observar como la forma del *pinhole* en aluminio es más circular y uniforme que la del *pinhole* comercial, cuyo tamaño ideal debería ser de $5\mu m$.

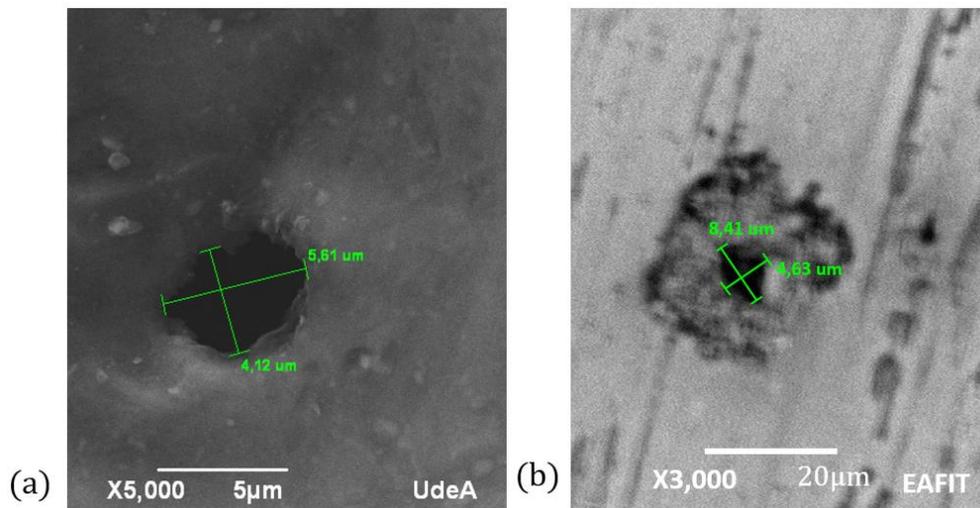


Figura 19. (a) Imagen de un *pinhole* manufacturado en aluminio, observado a 5000 aumentos en el SEM de la Universidad de Antioquia. (b) Imagen de un *pinhole* comercial de Newport de $5\mu m$ observado a 3000 aumentos en el SEM de la Universidad EAFIT.

Debido a que la finalidad de este proyecto es capturar imágenes utilizando el sensor de un dispositivo móvil, se tomaron hologramas de un mismo objeto con un sensor CMOS y el sensor de un dispositivo móvil a modo de comparación.

El sensor CMOS utilizado es de Thorlabs y cuenta con 1280×1024 píxeles cuadrados. El tamaño de píxel es de $3.6\mu m$. Debido a que se empleó una imagen cuadrada por la facilidad en la reconstrucción, el tamaño de esta área del sensor es de $3.6 \times 3.6\text{ mm}^2$. Bajo esta configuración, la resolución espacial teórica del sistema es de $3\mu m$ y tiene una apertura numérica de 0.12. Por otro lado, se utilizó la cámara

principal de un celular Samsung Galaxy S10 Plus, para capturar imágenes cuadradas de 3024x3024 píxeles. El tamaño lateral del píxel para este sensor es de $1\mu m$. Debido a que, en esta configuración, el haz de luz no llega directamente al sensor, sino que pasa por un arreglo de micro lentes, no se utiliza completamente su área, sino, aproximadamente el 50% de ella. Bajo estas condiciones se tiene una resolución espacial teórica de $7.5\mu m$ y una apertura numérica de 0.05.

En la Figura 20 se presentan los hologramas y sus respectivas reconstrucciones en intensidad para los elementos 4 y 5 del grupo 4 de un test USAF 1951. En (a) se muestran los resultados utilizando la cámara Thorlabs antes descrita y en (b) utilizando la cámara del celular.

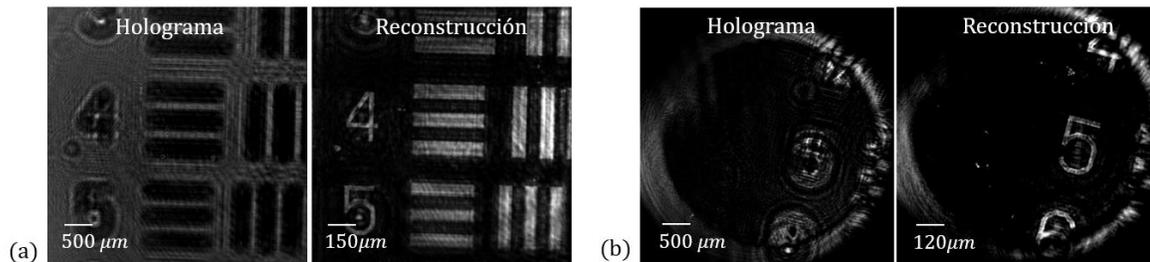


Figura 20. Hologramas y reconstrucciones de los elementos 4 y 5 del grupo 4 de un test de resolución USAF 1951. Los hologramas fueron adquiridos con (a) un sensor CMOS de Thorlabs y (b) la cámara de un Samsung S10 +.

Para el análisis en polarización, se emplearon muestras que presentan algún tipo de información polarimétrica. La primera de ellas es el oxalato de calcio, cristal que se puede encontrar fácilmente en plantas del género *Agave* o en la piña. También se pueden encontrar residuos de estos cristales en muestras de orina de pacientes renales o en pacientes con enfermedades como la gota [6][7]. Este cristal presenta dicroísmo lineal inverso[7], por lo tanto cuando el PSA y PSG están paralelos su intensidad es mínima, y cuando estos están cruzados, la intensidad es máxima. En la Figura 21 se muestra el comportamiento dicroico anteriormente descrito de unos cristales de oxalato de calcio observados en un microscopio de campo brillante polarimétrico [8]. En el papel (c) se muestra la imagen dicroica (para 633 nm) de esta muestra, como era de esperarse, el valor numérico del dicroísmo para el cristal es de -1 .

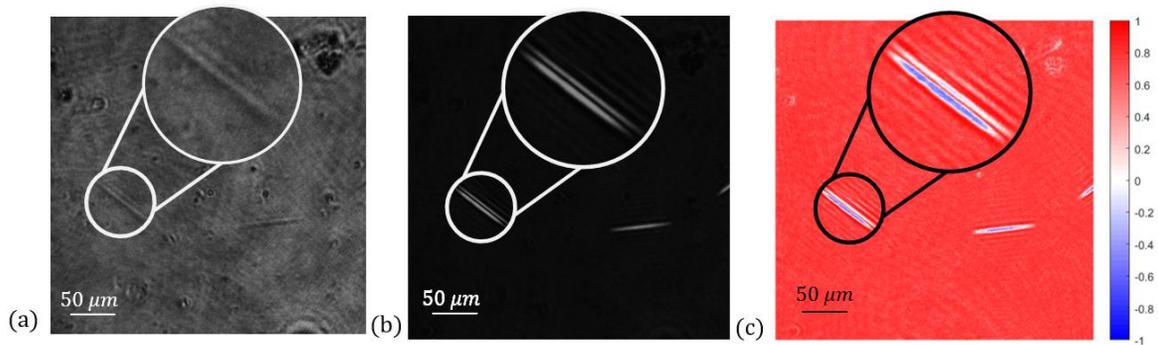


Figura 21. Imágenes de intensidad de una muestra con oxalato de calcio adquiridas en un microscopio polarimétrico de campo brillante [8] con (a) los PSG y PSA paralelos y (b) con los PSG y PSA cruzados. (c) Imagen dicroica de la muestra de oxalato de calcio.

La muestra se obtuvo a partir de la savia de una planta *Agave Chiapnesis*, la cual contiene altas proporciones de oxalato de calcio y se puso a prueba en el montaje en mesa óptica. Debido a que la savia es un elemento denso, la visualización de los cristales es compleja. En la Figura 22 (a) se muestra el holograma y la reconstrucción para una porción de la muestra, este holograma se capturó con el PSG y el PSA paralelos. En la reconstrucción se evidencia un cristal, sin embargo, su imagen no es muy clara, lo anterior es de esperar si se tiene en cuenta que el modelo de registro y reconstrucción DLHM supone como muestras espesores débiles, caso que no se cumple completamente con esta muestra. En la Figura 22 (b) se capturó el holograma en la misma zona de la muestra con el PSG y el PSA cruzados, en este caso, se evidencia la reconstrucción del cristal de forma más clara y con mejor detalle. Para estos resultados se calculó la imagen dicroica, la cual se puede observar en la Figura 22 (c). Esta imagen representa idóneamente el comportamiento polarimétrico de esta muestra, comparado con la Figura 21 (c).

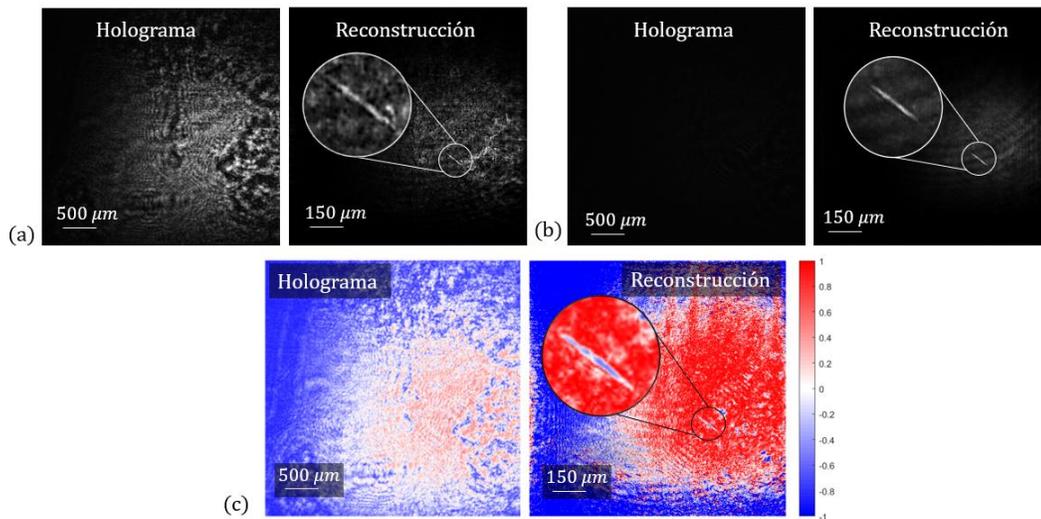


Figura 22. Hologramas y reconstrucciones de muestra con oxalato de calcio adquiridas en el microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica con (a) los PSG y PSA paralelos y (b) con los PSG y PSA cruzados. (c) Imágenes dicróicas del holograma de la muestra con oxalato de calcio y su reconstrucción.

Por otro lado, para la validación de esta implementación, se pusieron a prueba muestras birrefringentes. Para este caso, se obtuvo una muestra que contiene almidón de papa. Esta se preparó realizando un raspado a la parte interna de una papa. El líquido obtenido se ubicó en un porta muestras con un cubre objetos. Al secarse quedan zonas donde se aglomeran los compuestos del raspado de papa, que contienen en buena proporción granos de almidón. En la Figura 23 (a) se muestra una imagen de campo brillante de una porción de la muestra adquirida. Cuando se observan gránulos de almidón de papa con luz polarizada estos exhiben diferentes patrones birrefringentes en la forma de cruces de Malta [9]. Los patrones birrefringentes se pueden cruzar, combinar o incluso pueden desaparecer para algunas muestras. La birrefringencia positiva en estas muestras indica que el grano tiene un alto grado de moléculas o cristales alineados [9]. En la Figura 23 (b) se muestra una imagen de campo brillante de almidón de papa teñido con yodo, y la Figura 23 (c) muestra el comportamiento birrefringente del almidón de papa cuando este se observa con luz polarizada. Estas imágenes fueron tomadas de la referencia [9].

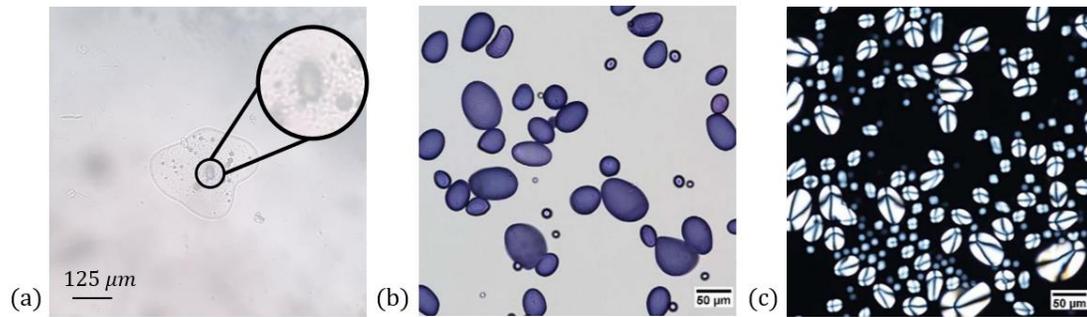


Figura 23. (a) Imagen de campo brillante de una sección de la muestra de papa preparada. (b) Imagen de campo brillante de granos de papa. (c) Imagen polarimétrica de granos de papa (Observadas con un PSG y PSA cruzados). Las imágenes (b) y (c) fueron tomadas de [9].

Los resultados de las imágenes capturadas por el microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica se muestran en la Figura 24. En (a) se presenta el holograma y la reconstrucción de la muestra de papa, aquí se evidencia de forma no muy clara la presencia de un grano de almidón de papa. Como se observa en el área magnificada, sin embargo, no se puede concluir totalmente que este es un grano de almidón. En (b) se presenta el holograma y la reconstrucción de la misma zona de la muestra, con el PSG y PSA cruzados, en este caso la reconstrucción del grano del almidón es de mejor calidad, su forma es mucho más clara que en la reconstrucción de la imagen (a), su forma ovalada y su intensidad bajo esta configuración dan cuenta de características propias un grano de almidón. Cuando los polarizadores están cruzados, se tiene la ventaja de que los elementos que no presentan actividad polarimétrica no aparecen en la reconstrucción, por tanto, la identificación de los elementos que sí presentan esta actividad se facilita.

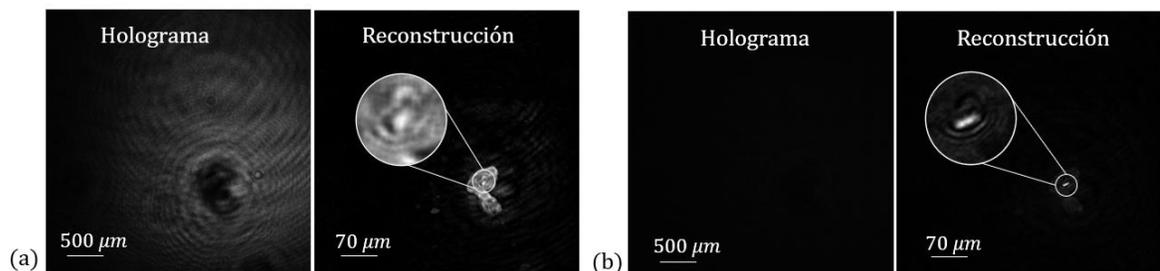


Figura 24. Hologramas y reconstrucciones de la muestra de papa con presencia de granos de almidón adquiridas en el microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica con (a) los PSG y PSA paralelos y (b) con los PSG y PSA cruzados.

4.2. Microscopio polarimétrico sin lentes portable (PPLM)

El primer elemento para considerar en el microscopio portable (PPLM) es la fuente de iluminación. La ventaja del uso de láser gaussiano es que permite enfocar toda la irradiancia del haz en un punto, acercándose a los límites de un sistema limitado por difracción, por lo tanto, no hay una pérdida significativa de intensidad a la salida del *pinhole*. Además de esto la potencia del láser, permite que los tiempos de exposición sean cortos facilitando así la captura de los hologramas, especialmente en las condiciones donde el PSG y PSA están cruzados.

Para la implementación del PPLM se optó por utilizar como fuente de iluminación un LED de alta potencia, que tiene un ancho de banda de aproximadamente 50 nm y cuyo pico se encuentra en los 512 nm como se puede observar en su espectrograma presentado en la Figura 25, este espectrograma fue medido con un miniespectrómetro de espacio libre de Newport [10]. Para aprovechar al máximo la potencia de este LED, este se alimenta con 3.8 V obtenidos de una batería Li-Ion recargable, logrando con esto una irradiancia de aproximadamente salida de 5 mW , de acuerdo al medida tomada con un medidor de potencia óptica PM100D con un sensor 120C, ambos de la marca Thorlabs [11].

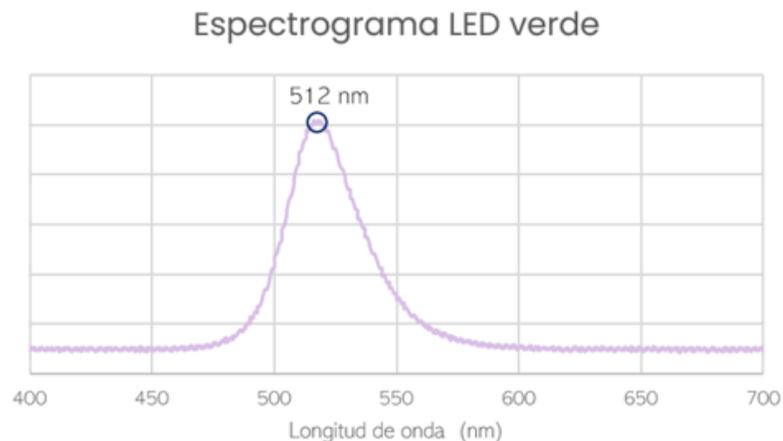


Figura 25. LED de alta potencia utilizado como fuente de iluminación en el microscopio polarimétrico sin lentes portable y su espectrograma.

Por otro lado, en el montaje en mesa óptica se utilizó un objetivo de microscopio para enfocar el haz gaussiano. Por el contrario, para el montaje portable se decidió diseñar e implementar un arreglo óptico sencillo y que ocupara el menor espacio posible para realizar este trabajo. Teniendo esto en cuenta y también la disponibilidad de lentes del laboratorio de Óptica Aplicada, se decidió utilizar dos lentes plano convexas cuyas referencias y especificaciones se presentan en la Tabla 1.

	Marca	Referencia	Focal Efectiva (mm)	Diámetro (mm)	Precio (USD)	
L1	Newport	KPX076	25.4 ± 0.2	24.5	\$34	[12]
L2	Thorlabs	LA1540-A	14.9 ± 0.1	12.7	\$33.83	[13]

Tabla 1. Especificaciones de las lentes utilizadas en el sistema de generación del haz divergente.

Con estas dos lentes, se llevó a cabo una simulación en Zemax® con el fin de optimizar las distancias entre ellas para tener el haz de salida más pequeño, la fuente extendida se simuló como tres fuentes puntuales, con una separación de $1\mu m$ entre ellas. En la Figura 26 se muestra el resultado de la simulación en el software Zemax®.

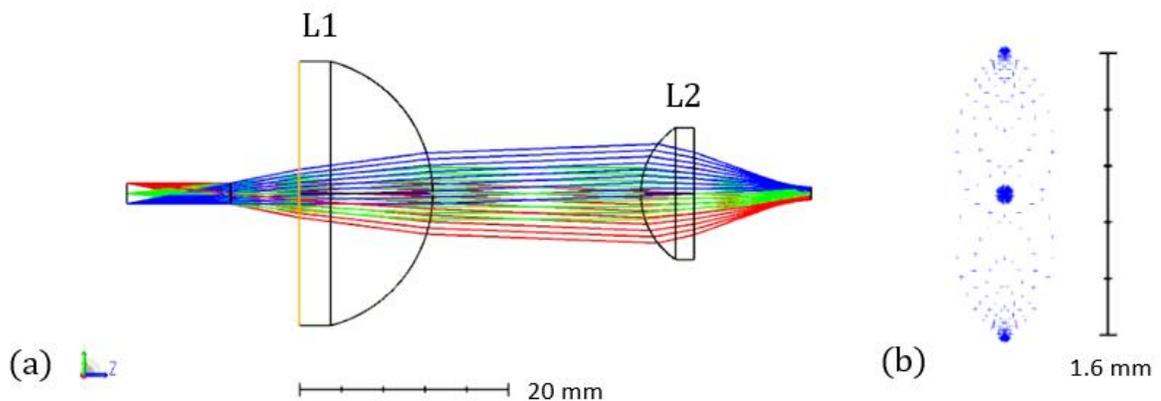


Figura 26. Simulación del sistema óptico de enfoque realizado en Zemax. (a) Visualización del trazado de rayos. (b) Visualización del haz de salida.

Este sistema óptico tiene una longitud de 65.7 mm y logra un spot de salida cuyo diámetro es de 1.6 mm aproximadamente. La lente L1 logra colectar alrededor del

15% de la irradiancia del LED. Posterior a este sistema óptico, se ubican los mismos elementos del montaje en mesa óptica: un *pinhole*, que para este caso también se utilizó uno elaborado manualmente en papel aluminio, luego la muestra, el PSA y por último el sensor. El esquema de este montaje óptico se presenta en la Figura 27.

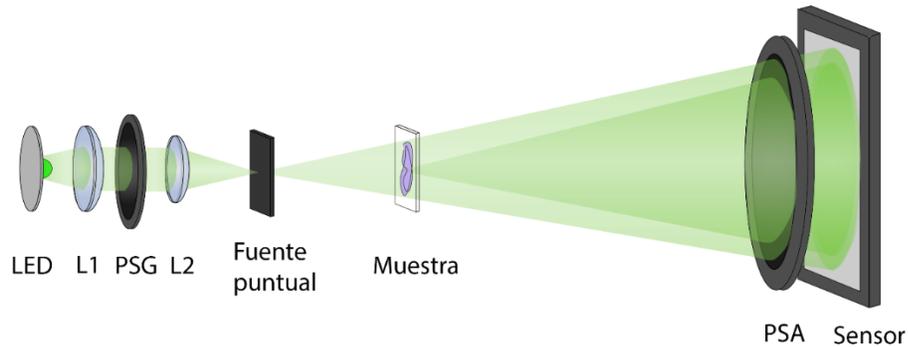


Figura 27. Esquema del montaje óptico del microscopio polarimétrico sin lentes portable.

Una vez definidos los elementos ópticos y demás componentes que conforman el prototipo portable, sus dimensiones y las distancias entre ellos, se diseñó el acople mecánico que ensambla todos estos elementos y hace posible que el dispositivo sea portable y que además pueda ser utilizado fácilmente con un teléfono móvil. La primera etapa de diseño consistió en evaluar los grados de libertad que tiene cada elemento del microscopio, considerando los desplazamientos que cada uno tiene que realizar. En la Tabla 2 se presentan todos los elementos que conforman el PPLM, su modelo CAD y el (los) grado (s) de libertad que tiene cada pieza.

Elemento	CAD	Grado (s) de libertad
Batería	-	● Rígido
Botón ON/OFF		● Rígido
Disipador LED		● Rígido
LED		● Rígido

Apertura		● Rígido
PSG		● Z  Deslizador  Angular
L1		● Z  Deslizador
L2		● Z  Deslizador
Pinhole		  Planar
Muestra		  Deslizador
PSA		● Rígido
Cámara celular	-	● Rígido

Tabla 2. Elementos que conforman el PPLM, su modelo CAD y el (los) grado (s) de libertad que tienen en el acople mecánico.

Una vez definidos los elementos mecánicos involucrados, se realizó un modelo CAD de las piezas necesarias para el correcto ensamble y funcionamiento del dispositivo, verificando con este modelo que todos los grados de libertad requeridos para cada elemento se supliera. En la Tabla 3 se especifican las trece piezas que conforman el dispositivo.

Pieza	Elementos que soporta	Modelo CAD	Fotografía	Precio (COP)
1	-Botón ON/OFF			2500
2	-Disipador -LED			5000
3	-Iris -Ejes -Carcasa			5000
4-5	-PSG			2250
6-7	-L1			5000
8-9	-L2			4000
10	-Pinhole			2500
11	-Porta muestras			2500
12	-			7500

13	-PSA			3000
----	------	-----------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	------

Tabla 3. Elementos mecánicos que conforman el PPLM, con las piezas que cada uno soporta, el modelo CAD, la fotografía y el precio de la impresión.

Las trece piezas que conforman el acople mecánico fueron impresas en 3D con la colaboración y el patrocinio de Solid3D, un emprendimiento liderado por el estudiante de Ingeniería Física José Manuel Rendón [14]. El costo total del prototipo mecánico es de aproximadamente \$40.000 COP.

Teniendo en cuenta todos los elementos que conforman el PPLM se estima que el precio total de este es de aproximadamente \$140 USD, el costo de cada elemento se detalla en la Tabla 4.

Elemento	Precio (USD)
Lentes	64
Iris ID12 Thorlabs	50
Impresión 3D	10
LED	1
Disipador + Ejes	5
Batería + Cargador	10
Total	140

Tabla 4. Costo de cada elemento que conforma el PPLH y precio total del dispositivo.

El PPLH ensamblado tiene una altura de 10 cm y pesa 170 gr. Las fotografías del dispositivo final se muestran en la Figura 28.



Figura 28. Fotografías del microscopio polarimétrico sin lentes portable de perfil (izquierda) y de frente (derecha) acompañado del celular con el que se adquieren los hologramas.

Como validación de la calidad de los hologramas que se pueden capturar en este dispositivo portable se capturaron imágenes de un test USAF, bajo las mismas configuraciones presentadas en sección 4.43 *Microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica*, específicamente en la Figura 20. Debido a que las distancias y los sensores se conservan, las resoluciones tanto para la cámara Thorlabs y el celular se mantienen, sin embargo, como la potencia de la fuente disminuyó significativamente, los tiempos de exposición deben ser aumentados, sacrificando con esto la calidad de los hologramas y por tanto la calidad en su reconstrucción.

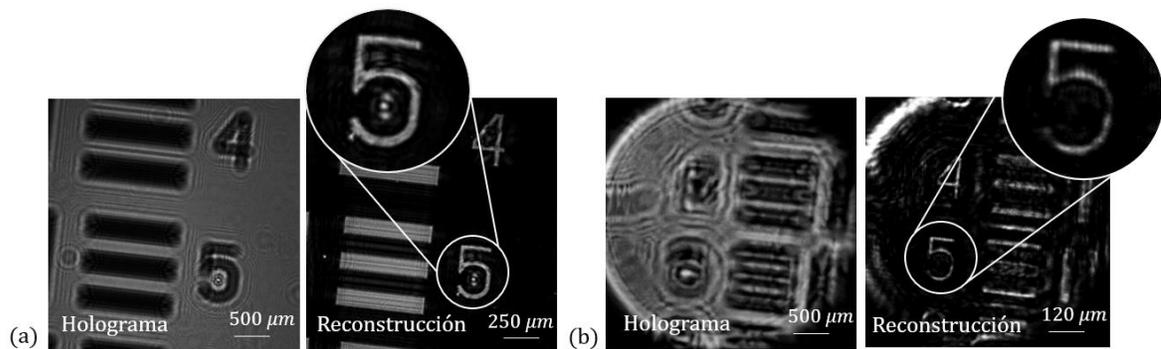


Figura 29. Hologramas y reconstrucciones de un test USAF. (a) Elementos 4 y 5 del grupo 3 adquiridos utilizando el PPLH y capturados con un sensor CMOS de Thorlabs y (b) elementos 4 y 5 del grupo 4, adquiridos utilizando el PPL y la cámara de un Samsung S10 +.

Por otro lado, como segunda validación en la Figura 30 se comparan las imágenes en intensidad de un microscopio de biológico PLEUGER XSZ-107 con las obtenidas con el PPLM. Inicialmente se ubicó en el plano de la muestra la antena de un espécimen del orden *Hymenoptera*. Debido a que este elemento no es delgado, en la reconstrucción del holograma se encuentran varios planos de enfoque. La reconstrucción recrea idóneamente la mayoría de los detalles de esta muestra.

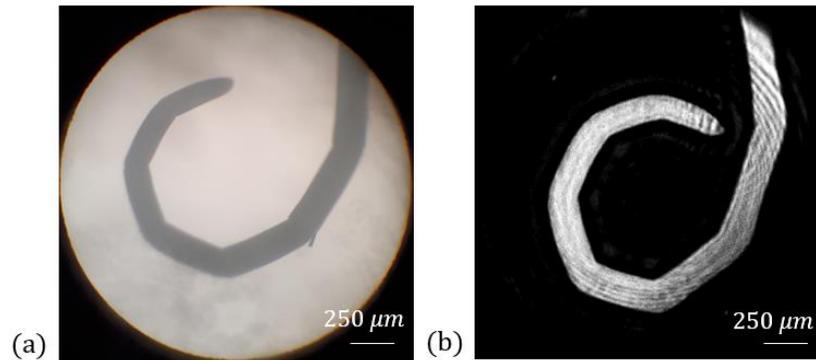


Figura 30. Imágenes de campo brillante de la antena de un espécimen del orden *Hymenoptera* capturadas con (a) un microscopio biológico PLEUGER XSZ-107 con objetivo de microscopio 20x y (b) el PPLM.

Otra validación importante que se hizo fue en torno a la capacidad del PPLM de capturar información de fase, para ello se capturaron hologramas en el PPLM de un elemento que tuviera información de fase y también se capturaron imágenes para el mismo elemento en un montaje de microscopía holográfica digital DHM. Se utilizó como muestra una *Eisena fétida* más conocida como lombriz roja o lombriz californiana en sus primeras etapas de vida. En esta etapa las lombrices son muy pequeñas, de alrededor de 40 mm de longitud y su debido a que su anillos segmentales no se han desarrollado completamente, su cuerpo es transparente [15]. Las muestras translúcidas resultan complejas de observar en un microscopio de campo brillante, debido a que estos elementos no cambian significativamente la intensidad de la luz que pasa a través de ellas. En la Figura 31 (a) se muestra una imagen de campo brillante capturada con un microscopio biológico PLEUGER XSZ-107 con objetivo 5x. Se pueden observar ciertas partes de la lombriz que son translúcidas, especialmente cerca de sus bordes. La lombriz observada presentaba tierra por dentro, por lo tanto, no todo su cuerpo es translúcido e identificarla en este dispositivo fue sencillo. Por otro lado, se capturó una imagen holográfica de la

muestra en un microscopio holográfico digital [16], este montaje tiene una magnificación total de 44x y una resolución lateral de aproximadamente $0.8\mu m$. Se reconstruyó una imagen de fase de la muestra, la cual fue desenvuelta haciendo uso de un algoritmo de Flynn [17]. Este resultado se muestra en la Figura 31 (b). Aquí se puede observar que en general esta sección de la lombriz presenta información de fase, también es mucho más notorio el borde de la lombriz, donde el valor de fase es más elevado y esto puede estar dado porque esta sección de la lombriz es más densa, por lo tanto, su índice de refracción es mayor. También se realizó una adquisición de otra sección de la muestra en el PPLM, y a pesar de que la magnificación y resolución no es comparable con el DHM presentado anteriormente, el cual es un montaje óptico muy robusto, sí es comparable la respuesta que ambos dispositivos tienen a los elementos de fase. Para este resultado, se calculó la fase, la cual se compensó y posteriormente fue desenvuelta. Se utilizó un algoritmo de desenvolvimiento de fase vía cortes de gráfica [18]. Posteriormente se le incrementó el contraste a la imagen de salida, y se le aplicó un filtro gaussiano a la zona de la imagen que no contiene información de la muestra. Estas imágenes se muestran en la Figura 31 (c). En este resultado, tal como en el anterior se observa que toda la lombriz tiene información de fase y también se evidencia cómo el borde de la lombriz presenta un valor más elevado de fase. Esta validación permite verificar que el dispositivo tiene la capacidad de capturar información de fase, que a su vez permite obtener información adicional del objeto como como su espesor, índice de refracción, densidad y concentración [2].

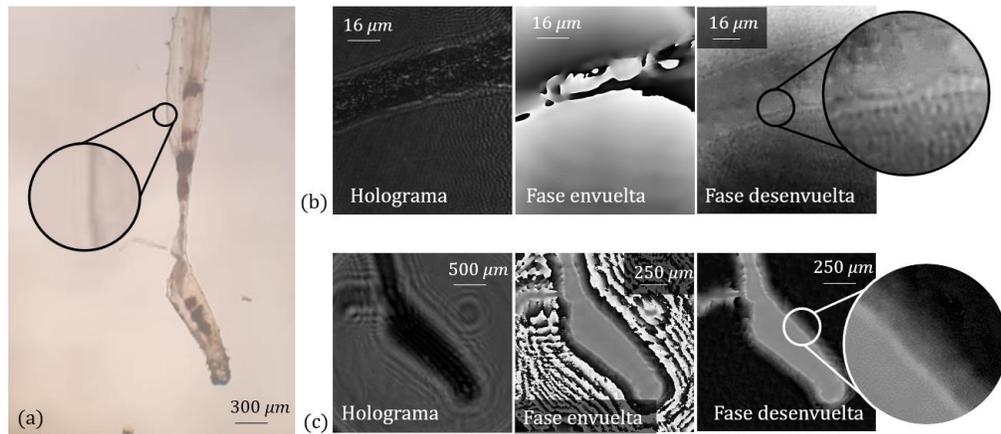


Figura 31. (a) Imagen de campo brillante de una lombriz californiana adquirida con un microscopio biológico PLEUGER XSZ-107 y objetivo de microscopio 5x. (b) Holograma, reconstrucción en fase envuelta y desenvuelta de la muestra adquirido con un DHM [16]. (c) Holograma, reconstrucción en fase envuelta y desenvuelta de la muestra adquirido con el PPLM.

Por último, la validación de la capacidad del PPLM de adquirir información polarimétrica se realizó empleando la muestra birrefringente que contiene granos de almidón de papa. En la Figura 32 se muestra el holograma (a) y la reconstrucción (b) de la muestra en cuestión, observada con el PSG y PSA perpendiculares. En la reconstrucción se evidencian dos lóbulos correspondientes a un grano de papa, en el área magnificada en (b) se sombrearon con morado estos dos lóbulos, y se marcó la línea entre ellos, esta línea negra es característica a este comportamiento birrefringente como se mostró en la Figura 23 (c).

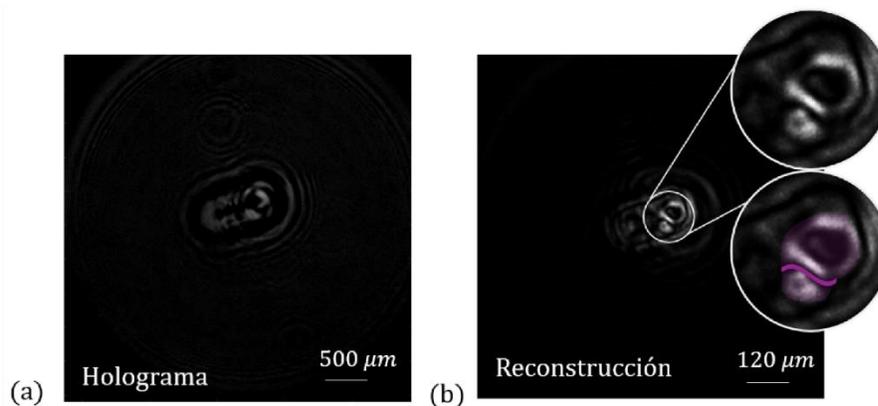


Figura 32. Holograma y reconstrucción de la muestra de papa con presencia de granos de almidón adquiridas en el PPLM con el PSA y PSG cruzados.

4.3. Referencias

- [1] C. Trujillo, P. Piedrahita-Quintero, and J. Garcia-Sucerquia, "Digital lensless holographic microscopy: numerical simulation and reconstruction with ImageJ," *Appl. Opt.*, vol. 59, no. 19, p. 5788, Jul. 2020.
- [2] M. Kim K, *Digital Holographic Microscopy, Principles, Techniques, and Applications*, vol. 2. 2012.
- [3] Newport Corporation, "M-20X Microscope Objective Lens." [Online]. Available: <https://www.newport.com/p/M-20X>. [Accessed: 17-Oct-2020].
- [4] J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, P. Klages, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy," *Appl. Opt.*, vol. 45, no. 5, pp. 836–850, 2006.
- [5] "0.875-20 Molybdenum Pinhole." [Online]. Available: <https://www.newport.com/f/high-energy-pinhole-apertures>. [Accessed: 27-Oct-2020].
- [6] C. Cano, "TESIS DE MAESTRÍA: Diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada para la medición cuantitativa de propiedades polarimétricas en muestras biológicas," Universidad EAFIT, 2017.
- [7] I *et al.*, "Phase and Polarization Contrast Methods by Use of Digital Holographic Microscopy: Applications to Different Types of Biological Samples," *Intech*, vol. i, no. tourism, p. 13, 2012.
- [8] M. J. Lopera and C. Trujillo, "Polarimetric Microscope for Malaria Infected Red Blood Cells Analysis ."
- [9] X. Zhao, M. Andersson, and R. Andersson, "Resistant starch and other dietary fiber components in tubers from a high-amylose potato," *Food Chem.*, vol. 251, no. June, pp. 58–63, 2018.
- [10] Newport Corporation, "325 Spectroscopy Instruments Filter and Cuvette Holders for Minispectrometers 78380 Filter/Cuvette Holder."
- [11] Thorlabs, "Digital Handheld Optical Power and Energy Meter Console." [Online]. Available: https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=3341. [Accessed: 28-Oct-2020].
- [12] Newport, "KPX076 Plano-Convex Lens." [Online]. Available: <https://www.newport.com/p/KPX076>. [Accessed: 19-Oct-2020].
- [13] "Thorlabs - LA1540-A N-BK7 Plano-Convex Lens, Ø1/2", f = 15 mm, AR Coating: 350 - 700 nm." [Online]. Available: <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=LA1540-A>.

- [Accessed: 19-Oct-2020].
- [14] “Solid 3D (@solid3dprint) • Fotos y videos de Instagram.” [Online]. Available: <https://www.instagram.com/solid3dprint/?hl=es-la>. [Accessed: 19-Oct-2020].
 - [15] Uncle Jim’s Worm Farm, “Red Worm Anatomy - Eisenia fetida - the Perfect Composting Worm,” 2020. [Online]. Available: <https://unclejimswormfarm.com/anatomy-red-wiggler-composting-worm/>. [Accessed: 04-Nov-2020].
 - [16] C. Trujillo, R. Castañeda, P. Piedrahita-Quintero, and J. Garcia-Sucerquia, “Automatic full compensation of quantitative phase imaging in off-axis digital holographic microscopy,” *Appl. Opt.*, vol. 55, no. 36, p. 10299, Dec. 2016.
 - [17] T. J. Flynn, “Two-dimensional phase unwrapping with minimum weighted discontinuity,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 14, no. 10, p. 2692, Oct. 1997.
 - [18] J. M. Bioucas-Dias and G. Valadão, “Phase unwrapping via graph cuts,” in *Lecture Notes in Computer Science*, 2005, vol. 3522, no. 1, pp. 360–367.

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

La sensibilidad a la polarización de un microscopio polarimétrico sin lentes permite mejorar la visualización de algunas secciones de las muestras con comportamientos birrefringentes y dicroicos. Esta premisa fue comprobada en los resultados polarimétricos obtenidos tanto con el microscopio polarimétrico sin lentes en mesa óptica como con el PPLM. Este dispositivo tiene la ventaja de que al observar una muestra que contiene elementos que presentan algún tipo de actividad polarimétrica, el campo óptico de la porción de la muestra que no tiene información importante (la savia, por ejemplo, en el caso del oxalato de calcio) no será capturada, logrando una mejor visualización del objeto en las reconstrucciones y con esto un mejor análisis de las muestras. Esto es un importante desarrollo en el ámbito de la microscopía portable debido a que le otorga al dispositivo la capacidad de detectar con mayor facilidad ciertas estructuras microscópicas. Por ejemplo, se ha reportado que los pacientes en los que se encuentre una alta proporción de oxalato de calcio en su orina pueden ser diagnosticados con gota [1]–[3] o a ser propensos a desarrollar cálculos renales. Con el PPLM se podrían identificar estos elementos de forma más sencilla y económica, gracias a su sensibilidad polarimétrica, resolución y magnificaciones adecuadas, con el fin otorgar diagnósticos a estas condiciones médicas.

El dispositivo, además de tener la capacidad de capturar información polarimétrica, al hacer uso de una técnica holográfica, tiene sensibilidad a elementos de fase, permitiendo con esto ampliar la gama de objetos que puede observar además de otorgarle la capacidad de obtener información adicional del objeto como como su espesor, índice de refracción, densidad y concentración [4]. Esta sensibilidad fue validada y comparada con la de un microscopio holográfico digital [5].

La calidad de las reconstrucciones en intensidad de muestras biológicas se contrastó con un microscopio biológico PLEUGER XSZ-107. Para elementos que

están por encima de la resolución del PPLM las imágenes en intensidad representan de manera idónea el objeto y sus detalles. Además, el dispositivo propuesto permite observar objetos que tienen distintos planos de enfoque gracias a su capacidad de reconstruir información plano a plano a lo largo de un volumen de reconstrucción.

El estudio de los fundamentos de microscopía y polarimetría, así como las simulaciones implementadas, permitieron desarrollar correctamente un montaje en mesa óptica con elementos ópticos de alta calidad y desarrollar un montaje en un acople portable. Para el montaje portable se evaluaron las condiciones necesarias con el fin de obtener una relación equilibrada entre la disponibilidad, el tamaño y el precio de los elementos utilizados.

El microscopio polarimétrico sin lentes portable PPLM manufacturado tiene la capacidad de adquirir hologramas digitales en un teléfono móvil para posteriormente reconstruir en un computador imágenes de campo brillante, imágenes polarimétricas y de fase de muestras cuyos tamaños son mayores a $8\mu m$. Debido a que este dispositivo no utiliza ninguna técnica invasiva lo hace ideal para adquirir imágenes de muestras biológicas, como lo fueron los resultados presentados en la sección de implementación.

El precio del PPLM es de alrededor de 140 USD, un precio bajo comparado con otros dispositivos que pueden realizar sus mismas funciones. En la Tabla 5 se presentan las características del PPLM, las de un microscopio portable comercial de la marca Carson® y un microscopio polarimétrico de laboratorio binocular de la marca AmScope. El PPLM tiene un precio medio entre estos dos dispositivos, siendo mucho menor que el precio del microscopio de laboratorio y tiene la ventaja de adquirir información plano a plano de un volumen de inspección, polarimétrica y además tener sensibilidad a objetos traslúcidos, es decir que son esencialmente de fase, lo cual cumple con todos los objetivos esperados de este dispositivo.

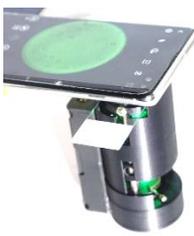
Microscopios	PPLM	Carson® MP-250 Handled Microscope [6]	AmScope: Microscopio Polarimétrico Binocular [7]
Fotografía			
Precio	140 USD	15 USD	1600 USD
Tamaño	6x4x9 cm	3.5x2.5x14 cm	28x17.8x35 cm
Peso	120gr	74gr	9000gr
Fuente de alimentación	Batería recargable	AA- no incluida	110V
Digital	SÍ	SÍ	NO
Magnificación	[1-20X]	[100-250X]	[4X,10X,40X]
Resolución	8 μ m	-	0.5 μ m
Imágenes campo brillante	SÍ B/N	SÍ COLOR	SÍ COLOR
Información 3D	SÍ	NO	NO
Información polarimétrica	SÍ	NO	SÍ
Sensibilidad en fase	SÍ	NO	NO

Tabla 5. Comparación de características entre el PPLM, un microscopio portable de CARSON y un microscopio de campo brillante de AmScope.

Se lograron obtener con el PPLM resultados tanto de campo brillante, polarimétricos y de fase comparables con microscopios biológicos, microscopios polarimétricos [8] y microscopios holográficos digitales [5]. Sin embargo, se propone seguir trabajando en disminuir la pérdida de intensidad ocasionada por el filtrado espacial diseñado, además de el hecho de que no se utiliza completamente el sensor del teléfono móvil. Estos son factores importantes que definen la resolución del sistema y la calidad de las imágenes. Se propone seguir trabajando y mejorando la fuente de iluminación junto con el sistema de enfoque.

Por otro lado y continuando con el enfoque de potenciar diagnósticos, se reportó en el desarrollo de un microscopio polarimétrico de campo brillante que los parásitos

plasmodium que generan la enfermedad de malaria pueden ser detectados con mayor facilidad al adquirir imágenes dicróicas (ecuación (3.21)) de muestras de sangre [8][9], para que esta enfermedad pueda ser detectada en el PPLM se debe garantizar que la resolución del mismo esté cercana a los $4 \mu m$ y que la intensidad de la fuente sea suficiente para capturar la información polarimétrica del parásito cuando el PSG y PSA están paralelos, representando un reto y un trabajo futuro importante por el cual vale la pena continuar con el desarrollo y mejoramiento de este proyecto.

Como última propuesta de trabajo futuro para este proyecto, y debido a que se pretenden aprovechar las capacidades tanto en hardware como en software del dispositivo móvil que se utiliza con el PPLM, se plantea desarrollar un software que permita realizar las reconstrucciones numéricas de los hologramas capturados directamente en el teléfono móvil, y con esto darle facilidad al uso del dispositivo además de dejar abierta la posibilidad de implementar en él más algoritmos que mejoren la calidad y la autonomía del mismo

5.1. Referencias

- [1] M. M. Corkill, "Gout," *N. Z. Med. J.*, vol. 107, no. 984, pp. 337–339, 1994.
- [2] Y. Yoo, Y. J. Seo, M. Huh, J. H. Yoo, K. H. Yun, and S. J. Kim, "Gout and coexisting pseudogout in the knee joint," *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, vol. 19, no. 4, pp. 553–555, Apr. 2011.
- [3] C. Cano, "TESIS DE MAESTRÍA: Diseño e implementación de un microscopio de luz polarizada para la medición cuantitativa de propiedades polarimétricas en muestras biológicas," Universidad EAFIT, 2017.
- [4] M. Kim K, *Digital Holographic Microscopy, Principles, Techniques, and Applications*, vol. 2. 2012.
- [5] C. Trujillo, R. Castañeda, P. Piedrahita-Quintero, and J. Garcia-Sucerquia, "Automatic full compensation of quantitative phase imaging in off-axis digital holographic microscopy," *Appl. Opt.*, vol. 55, no. 36, p. 10299, Dec. 2016.
- [6] Carson, "MicroFlip - Carson." [Online]. Available: <https://carson.com/es/products/microflip/>. [Accessed: 29-Oct-2020].
- [7] AmScope, "Binocular Polarizing Microscope 40X-800X." [Online]. Available: https://www.amscope.com/compound-microscopes/polarizing-microscopes/binocular-polarizing-microscope-40x-800x.html#product_tabs_description_tabbed. [Accessed: 31-Oct-2020].
- [8] M. J. Lopera and C. Trujillo, "Polarimetric Microscope for Malaria Infected Red Blood Cells Analysis ."
- [9] C. W. Pirnstill and G. L. Coté, "Malaria Diagnosis Using a Mobile Phone Polarized Microscope," *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–13, 2015.