

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS

DISEÑO, MONTAJE Y PRUEBA DE UN SISTEMA COMPACTO DE MICROSCOPIA HOLOGRAFICA DIGITAL EN GEOMETRIA DE TRANSMISION

**TRABAJO DE TITULACION PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE
FISICO**

PROYECTO DE INVESTIGACION

JUAN FERNANDO MOLINA MOROCHO

juan.molina@epn.edu.ec

DIRECTOR: CÉSAR COSTA VERA, Ph.D.

cesar.costa@epn.edu.ec

Quito, agosto del 2019

DECLARACIÓN

Yo, Juan Fernando Molina Morocho, declaro bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la Escuela Politécnica Nacional, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.



Juan Fernando Molina Morocho

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por JUAN FERNANDO MOLINA MOROCHO, bajo mi supervisión.



César Augusto Costa Vera

AGRADECIMIENTO

Agradezco mis padres y hermana por su apoyo durante toda mi vida.

A mi director de tesis, Dr. César Costa Vera, que más que un tutor ha sido un amigo, por su guía y apoyo constante en temas académicos y personales.

A mis compañeros del Laboratorio de Espectroscopía en especial a Camilo Díaz por su ayuda en temas experimentales y consejos durante mi carrera universitaria.

DEDICATORIA

A mis padres y hermana.

ÍNDICE

Índice	6
Índice de tablas	8
Índice de figuras	9
Resumen	10
Abstract.....	11
1 Introducción.....	12
1.1 Estructura.....	13
2 Microscopio sin lentes: fundamento teórico.....	15
2.1 Obtención del holograma.....	15
2.1.1 Dispersión e interacción de la luz y materia.....	15
2.1.2 Holograma	15
2.1.3 Interferograma	16
2.1.4 Geometría de transmisión.....	16
2.1.5 Holografía digital	18
2.2 Reconstrucción numérica	19
2.2.1 Ondas planas y frente de onda.....	19
2.2.2 Formación del holograma en línea	19
2.2.2.1 Funcion de transmisión y onda de salida.....	19
2.2.2.2 Integral de fresnel-kirchhoff y obtención del holograma	20
2.2.3 Reconstrucción del holograma en amplitud y fase	22
2.2.3.1 Transformada de fourier	22
2.2.3.2 Ventana de hann en el dominio de fourier.....	23
2.2.3.3 Método del espectro angular.....	24
2.2.3.4 Propagación del espectro angular	25
3 Metodología.....	27
3.1 Materiales	27
3.2 Prueba de instrumentos.....	28
3.3 Montaje del sistema en línea y obtención del interferograma	29
4 Reconstrucción numérica de la imagen	32
4.1 Simulación del holograma	32
4.2 Reconstrucción numérica	34
5 Resultados y discusión.....	41

5.1	Implementación del dispositivo.....	41
5.1.1	Construcción de partes por impresión 3d	41
5.1.2	Calibración.....	43
5.1.3	Pre-procesamiento de imagen.....	44
5.2	Aplicación interativa ejecutable	48
5.3	Prototipo de impresión 3d.....	48
5.4	Obtención, procesamiento e interpretación de los hologramas	50
6	Conclusiones.....	65
7	Referencias	68
8	Anexos.....	70
	Anexo 1.....	70
	Anexo 2.....	70
	Anexo 3.....	73
	Anexo 4.....	77
	Anexo 5.....	77
	Anexo 6.....	78
	Anexo 7.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3. 1	Comparación entre tres tipos de sensores cmos	29
Tabla 3. 2	Hologramas simulados.	33
Tabla 3. 3	Reconstrucción numérica. 1	39
Tabla 3. 4	Configuración impresora anet a8.....	42
Tabla 3. 5	Calibración del sistema.	44
Tabla 3. 6	Preprocesamiento..	45
Tabla 3. 7	Filtros de imagen.....	46
Tabla 4. 1	Comparativa estructuras 3d en distintas impresoras.....	48
Tabla 4. 2	Reconstrucción Blanco de Prueba.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 Interferograma.....	16
Figura 2. 2 Esquema holografía en línea.....	17
Figura 2. 3. Comparación del campo de visión del sistema de holografía en geometría de transmisión [1].	18
Figura 2. 4 Esquema holografía en línea con ondas planas..	21
Figura 2. 5 Transformada de fourier..	23
Figura 2. 6 Ventana de Hann.....	23
Figura 3. 1 Montaje del sistema en línea.....	30
Figura 3. 2 Esquema sistema en línea.....	31
Figura 3. 3 Muestra de prueba.	33
Figura 3. 4 Diseño 3d.....	41
Figura 3. 5 Ventana de Hann.aplicada.....	47
Figura 4. 1 Blanco de prueba “NBS 1952 resolution test target 3” x 1”.....	51
Figura 4. 2 Reconstrucción blanco de prueba..	52
Figura 4. 3 Reconstrucción blanco de prueba.	54
Figura 4. 4 Muestra de tuberculosis..	57
Figura 4. 5 Reconstrucción muestra de tuberculosis.....	58
Figura 4. 6 Muestra de tallos de calabaza.....	60
Figura 4. 7 Muestra de alas de polillas.....	61
Figura 4. 8 Muestra de micropartículas.....	63
Figura 4. 9 Reconstrucción de micropartículas.....	64

RESUMEN

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Espectroscopia, Departamento de Física de la Escuela Politécnica Nacional, tuvo como motivación diseñar y ensamblar un microscopio portable, ligero, robusto con un mayor campo de visión con relación a un microscopio tradicional. Como solución se presenta un sistema de microscopía basado en holografía digital que trabaja en dos partes: 1) la obtención del interferograma producido por la interacción de la fuente de luz y la muestra; 2) la reconstrucción numérica de una imagen de la muestra en base al interferograma.

El sistema holográfico escogido para la obtención del interferograma fue la microscopía holográfica digital sin lentes en geometría de transmisión. Una fuente de luz coherente ilumina la muestra produciendo un patrón de interferencias, formado debido a la interacción de ondas dispersadas y las no dispersadas. El sistema fue montado sobre una estructura impresa en 3D y trabaja con muestras ópticamente poco densas, en especial con partículas y permite obtener un campo de visión igual al área activa del sensor.

La reconstrucción numérica se llevó a cabo mediante el método del espectro angular. El interferograma grabado es transformado en una matriz de datos, estos datos son analizado en el espacio de frecuencias mediante una transformación de Fourier, luego se multiplica por un término propagador que emula el camino inverso que recorrió la luz desde la muestra al sensor. Finalmente, los datos resultantes son transformados al dominio espacial mediante la transformada inversa de Fourier. El código programado fue adaptado a un paquete ejecutable de MatLab para facilitar su uso.

El sistema de holografía sin lentes fue calibrado con el blanco de prueba "NBS 1952 Resolution Test Target 3" x 1'" permitiendo conocer la resolución del sistema $\sim 3\mu\text{m}$ y el rango de funcionamiento del microscopio, entre $3\mu\text{m}$ a los $\sim 400\mu\text{m}$ mediante reconstrucción holográfica y a partir de $500\mu\text{m}$ sin reconstrucción. Se tomaron imágenes del blanco de prueba, muestras de alas de polilla, células vegetas y nanopartículas de poliestireno.

ABSTRACT

The main purpose of this work was to design and assemble a portable, lightweight, robust microscope with a greater field of vision in relation to a traditional microscope at Spectroscopy Laboratory, Department of Physics of the National Polytechnic School. As a solution, there is a microscopy system based on digital holography that works in two parts: 1) obtaining the interferogram produced by the interaction of the light source and the sample; 2) the numerical reconstruction of an image of the sample based on the interferogram.

The chosen holographic system to obtain the interferogram was digital holographic lensless microscopy in transmission geometry. A coherent light source illuminates the sample producing an interference pattern, formed due to the interaction of dispersed and non-dispersed waves. The system was mounted on a 3D printed structure and works with optically low dense samples, especially with particles, the system gives a field of vision equal to the active area of the sensor.

The numerical reconstruction was performed by the angular spectrum method. The recorded interferogram is transformed into an array of data, this data is analyzed in the frequency space by a Fourier transformation, then it was multiplied by a propagator term that emulates the reverse path of the light traveled, from the sample to the sensor. Finally, the resulting data is transformed to the spatial domain by the inverse Fourier transform. The programmed code was adapted to an executable MatLab package for ease of use.

The lensless holography system was calibrated with the "NBS 1952 Resolution Test Target 3" x 1" test target, allowing to know the resolution of the system $\sim 3\mu\text{m}$ and the operating range of the microscope, between $3\mu\text{m}$ to $\sim 400\mu\text{m}$ by holographic reconstruction and from $500\mu\text{m}$ without reconstruction. Images of the test blank, samples of moth wings, vegetative cells and polystyrene nanoparticles were taken.

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad los microscopios son de gran importancia en las aplicaciones científicas, médicas e industriales. Los sistemas de microscopia tradicional son de gran tamaño, costosos, con lentes y partes móviles además de un campo de visión limitado por el objetivo [1]. Es necesario desarrollar un sistema de microscopia sin lentes, de gran campo de visión FOV, de bajo costo, y portable para aplicaciones en medicina, biología, biotecnología y medio ambiente [1,2,6].

La técnica de la holografía digital se presenta como una alternativa reciente a los microscopios tradicionales. En la actualidad debido al avance en el procesamiento de datos y capacidades de computo en ordenadores portátiles y tarjetas electrónicas la holografía digital ha cobrado gran importancia en el campo de la microscopía, medicina, biología etc. Los láseres compactos y sensores ópticos (CMOS) de gran resolución en tamaños reducidos han colaborado en el auge de sistemas compactos de costo competente de holografía para uso "in situ".

En el presente proyecto se propone el sistema de microscopio sin lentes basado en microscopía holográfica digital en línea (DIHM) o geometría de transmisión. El sistema DIHM permite obtener imágenes microscópicas en alta resolución, con un campo de visión grande que abarca toda el área activa del sensor (aproximadamente 10 mm^2) [5] mediante la obtención de interferogramas procesados numéricamente obteniendo una imagen de la muestra en amplitud y fase [1]. El sistema propuesto tiene un diseño compacto, un costo competitivo y fácil manejo en relación a un microscopio tradicional [5,2], Entre las aplicaciones de esta técnica se encuentran: la descripción del movimiento de células, monitoreo de cultivos de bacterias, estudio de muestras de patología [2], medicina, microbiología, telemedicina, entre otros [3][4].

El funcionamiento de nuestro sistema consiste en una fuente láser colimada mediante un pin-hole ilumina la muestra produciendo un interferograma sobre el

plano del sensor CMOS. La distancia entre el sensor y la muestra z_1 es de $< 1 \text{ mm}$ y la distancia del pin-hole a la muestra z_2 es de $\sim 25 \text{ mm}$ [2].

El mapa de interferencias grabado es reconstruido mediante distintos métodos numéricos como puede ser: método del espectro angular de ondas planas [2], aproximación de Fresnel [2], aproximación paraxial, entre otros. amplitud y una imagen de la fase de la muestra original.

1.1 ESTRUCTURA

El presente proyecto de investigación se divide en 2 partes principales, que son:

a) Diseño de un sistema de holografía en línea.

Se diseñó un sistema sin el uso de partes móviles y ópticas de holografía en geometría de transmisión. Una fuente de luz es alineada con un colimador o pin-hole para obtener luz parcialmente coherente que ilumina una muestra ópticamente poco densa produciendo un interferograma sobre el plano del sensor mediante la luz dispersada.

Se diseñó e imprimió una estructura 3D en resina y en plástico PLA con los parámetros óptimos de operación instrumental y metodología, como son las distancias entre la fuente-muestra z_2 , muestra-sensor z_1 , fuente de luz, pin-hole, sensor óptico, etc.

b) Reconstrucción Numérica de la Imagen

Se realizó un programa en MatLab R2018b, basado en propagación de ondas planas, que emula la propagación de la luz en el sistema. La interacción de la luz dispersada por la muestra y la luz no dispersada proveniente de la fuente producen un interferograma en el plano del sensor.

Posteriormente, se realizó un programa iterativo para reconstrucción en fase y amplitud del interferograma obtenido computacionalmente. El programa trabaja en el espacio de Fourier, deconvolucionando el mapa de interferencias y reconstruyendo numéricamente el frente de ondas. El algoritmo permite hallar los parámetros óptimos de configuración en las partes constitutivas del sistema.

Finalmente, se procedió a adaptar el programa para su funcionamiento con patrones de interferencia reales, obtenidos mediante el sistema diseñado, teniendo en cuenta la calibración previamente obtenida gracias a la simulación, añadiendo una interfaz intuitiva de fácil operación para el usuario final.

En este trabajo, se presenta los conceptos básicos y fundamentos físicos de la obtención del patrón de interferencia en geometría de transmisión en el Capítulo 2. En el Capítulo 3, se describe la metodología del trabajo experimental y de la reconstrucción computacional del interferograma. Las imágenes obtenidas y su interpretación son discutidos en el Capítulo 4. Con los resultados obtenidos se presenta un breve análisis de posibles mejoras tanto en el diseño como en la reconstrucción computacional, en base a este análisis se presentan las conclusiones en el Capítulo 5. Las referencias bibliográficas empleadas en este trabajo se presentan en el Capítulo 6. En los Anexos se presentan los códigos de programación y simulación y el manual de usuario para la construcción y operación del sistema.

2 MICROSCOPIO SIN LENTES: FUNDAMENTO TEÓRICO

El sistema de microscopio sin lentes trabaja en dos partes [7], la obtención del holograma en el sensor óptico (CMOS), y la reconstrucción del frente de onda para la obtención de una imagen de la muestra.

2.1 OBTENCIÓN DEL HOLOGRAMA

2.1.1 DISPERSIÓN E INTERACCIÓN DE LA LUZ Y MATERIA

La dispersión es el cambio de dirección de las ondas electromagnéticas debido a irregularidades en el medio conocidos como centros dispersivos o dispersores. La luz incide en el medio e interacciona sobre una muestra u objeto provocando el desvío de los fotones hacia una dirección aleatoria si la muestra es un centro de dispersión localizado (dispersión única), o hacia una dirección promedio si existen varios centros dispersivos (dispersión múltiple) [14].

La dispersión depende de la longitud de onda de la luz y del material dispersor, si la energía es conservada se debe a un proceso elástico (dispersión de Rayleigh), si la energía de los fotones que inciden cambia se trata de una dispersión inelástica (dispersión o fluorescencia Raman) [14,15].

2.1.2 HOLOGRAMA

El holograma fue descubierto en 1947 por el Físico Húngaro Dennis Gabor[9], pero fue perfeccionado con la invención del láser en 1960 por los científicos rusos N. Bassov y A. Prokhorov [10]. Un holograma es el registro de un patrón microscópico de franjas interferenciales producido la interacción de dos o más ondas coherentes provenientes de una fuente monocromática [11].

A diferencia de una fotografía que se obtiene al incidir luz sobre un sensor consiguiendo un mapa de intensidades debido a la luz que llega de una sola dirección a través de un lente, un holograma guarda información de más magnitudes además de la intensidad como la profundidad, además es un gran instrumento de medida ya que permite comparar un frente de onda con otro ha generado en un momento posterior.

Holograma proviene de la palabra griega *holos*, completo, y *gramma*, mensaje, y es debido a que un holograma contiene toda la información que los ojos ven, como son: la profundidad, tamaño, figura, posición relativa, entre otros. Es importante notar que cualquier parte del holograma contiene la información completa tridimensional del objeto [12,13].

2.1.3 INTERFEROGRAMA

Un interferograma, patrón de interferencias, imagen difractiva o mapa de interferencias es un holograma en dos dimensiones formado por la interacción de una onda de referencia y una onda objeto, o por el paso de la luz coherente por una rendija [16].

Las perturbaciones ondulatorias se obtienen por la interacción de dos o más ondas electromagnéticas, estas ondas coinciden en un punto a un instante dado y es la suma de las perturbaciones por separado obteniendo así el principio de superposición. (Ver [Figura 2.1](#)).

Un patrón de interferencias se obtiene cuando las ondas producidas por una luz coherente interaccionan. En el mapa de interferencias se observa zonas brillantes donde la interferencia es constructiva y la intensidad máxima e interferencia destructiva en las regiones oscuras donde la intensidad es mínima.

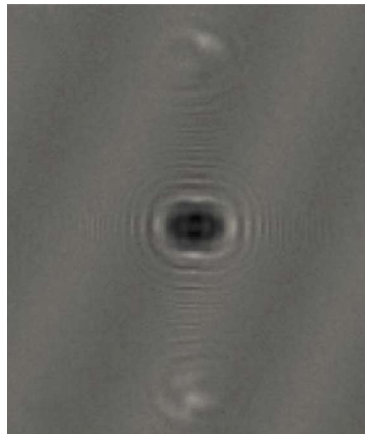


Figura 2. 1 Interferograma. Imagen de holograma sin procesar de una rejilla con medio paso de $1\mu\text{m}$ [1].

2.1.4 GEOMETRÍA DE TRANSMISIÓN

La técnica de holografía en geometría de transmisión u holografía en línea consiste en ubicar una muestra semitransparente sobre el sensor óptico (CMOS, CCD) a una distancia $z_1 \sim 1\text{mm}$, sin ningún elemento óptico de por medio [16].

Una fuente de luz coherente ilumina la muestra, la luz dispersada por la muestra, denotada como onda objeto O , interacciona con la luz no dispersada u onda referencia R generando un holograma en el sensor óptico, este holograma se conoce como mapa de interferencias, interferograma o imagen difractiva [17]. El interferograma obtenido guarda información de la muestra que puede ser reconstruida numéricamente. Debido al uso de luz coherente, por su temporalidad y espacialidad, el holograma en línea obtenido posee una reducción de ruido puntual producido por la dispersión de luz no colimada [18].

La resolución del sistema en línea depende del tamaño del píxel y de la relación señal/ruido o (S/R) que es la proporción existente entre la potencia de la señal que se transmite y la potencia del ruido que la corrompe [16]. El campo de visión (FOV por sus siglas en inglés, ver [Figura 2.3](#)) es igual al área activa del sensor (\sim orden de cm) y debido a la naturaleza holográfica se puede obtener información tridimensional de la muestra ya que se tiene una amplia profundidad de campo (DOF, por sus siglas en inglés) permitiendo, mediante un re-enfocamiento digital, la reconstrucción de diferentes planos abarcando una profundidad de $\sim 2\mu$. El esquema propuesto se observa en la [Figura 2.2](#).

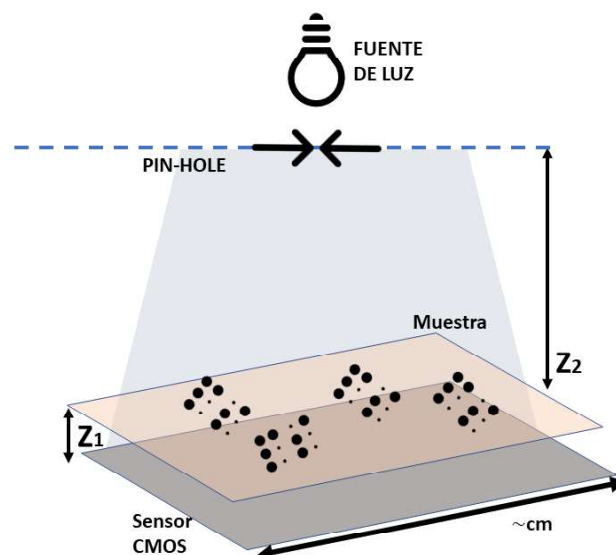


Figura 2. 2 Esquema holografía en línea. Configuración experimental general de sistemas en línea sin lentes en sensores CMOS.

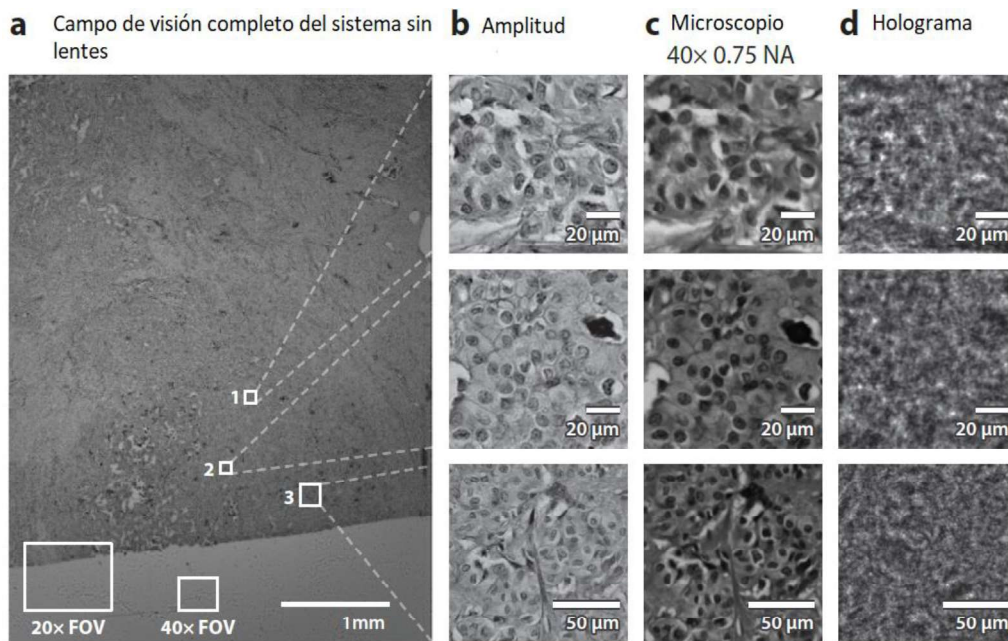


Figura 2. 3. Comparación del campo de visión del sistema de holografía en geometría de transmisión [1]. a) Imagen de amplitud de campo de visión completo (FOV) de un corte de tejido de carcinoma de mama humano teñido. (b) Regiones de interés ampliadas del panel a que muestran claramente las células individuales y sus núcleos. (c) Imagen de comparación de las mismas regiones utilizando un microscopio de campo claro convencional. (d) Ejemplos de algunas de las intensidades difractadas si procesar capturadas por el sensor.

2.1.5 HOLOGRAFÍA DIGITAL

La holografía digital es una técnica de imagen que trabaja con sistemas capaces de obtener información tridimensional de una muestra, mediante el procesamiento computacional del patrón de interferencia obtenido por la interacción de una onda de referencia plana y la onda emitida desde la muestra en la superficie del sensor [6]. Esta muestra por lo general es un cuerpo tridimensional con superficies difusas-reflectivas, relativamente separadas y ópticamente poco densas [5].

La técnica de holografía sin lentes permite obtener imágenes difractivas sin el uso de ningún lente de enfoque, ofreciendo las ventajas de un gran campo de visión, alta resolución, rentabilidad, portabilidad, resolución tridimensional, imágenes en tiempo real, muestras volumétricas y trayectorias [1-3]. Entre las aplicaciones de esta técnica están: metrología óptica [4] y microscopía de transmisión [5], telemedicina [2], en diagnóstico de enfermedades que requieren imágenes microscópicas de amplio campo de visión como la malaria [1], en

biología y biomedicina [6] y para el conteo y caracterización de bacterias, células y tejidos[8].

2.2 RECONSTRUCCIÓN NUMÉRICA

La reconstrucción numérica es clave en la técnica de holografía digital ya sea en geometría de transmisión o geometría fuera del eje, puesto que se encarga de analizar y procesar el interferograma. La imagen difractiva es transformada en una matriz de datos que es deconvolucionada para ser tratada en el espacio de Fourier. La función propagador simula el camino inverso de propagación del frente de ondas luego se aplica la transformada inversa de Fourier, obteniendo así la información de la muestra en fase y amplitud [1,16].

2.2.1 ONDAS PLANAS Y FRENTE DE ONDA

Las ondas planas son aquellas que poseen frecuencia constante y poseen dependencia de una coordenada espacial y una coordenada temporal [19]. Los frentes de onda de una onda tridimensional son superficies planas de fase constante [7]. Matemáticamente las ondas planas son solución de la ecuación de onda en su forma compleja como se presentan en la ecuación (1).

$$U(\vec{r}, t) = Ae^{i(\vec{r}\cdot\vec{k}-\omega t)} \quad (1)$$

Donde $\vec{r} = \vec{x} + \vec{y} + \vec{z}$ son los componentes rectangulares y $\vec{k} = \vec{k}_x + \vec{k}_y + \vec{k}_z$ es el vector de onda, A la amplitud compleja, i el número imaginario y ω la frecuencia angular.

Si se toma el origen en $\vec{z} = 0$ y el eje óptico a lo largo de la dirección de propagación de las ondas planas, se obtiene $\vec{k}_x = \vec{k}_y = 0$ [20].

2.2.2 FORMACIÓN DEL HOLOGRAMA EN LÍNEA

2.2.2.1 FUNCION DE TRANSMISIÓN Y ONDA DE SALIDA

La distribución de ondas que inciden desde la fuente hasta la muestra se encuentra representadas por:

$$U_{incidente}(x, y) \quad (2)$$

con (x, y) coordenadas en el plano objeto P_O . (Ver [Figura2.4](#)). La función de transmisión $t(x, y)$ [21,22], describe el objeto localizado por lo general en el plano \vec{z} , con el origen $z = 0$ y se representa en la ecuación (3).

$$t(x, y) = \exp\{-a(x, y)\} \exp\{i\Phi(x, y)\} \quad (3)$$

Donde $a(x, y)$ representa la absorción y $i\Phi(x, y)$ es la distribución de fase cuando la onda es dispersada por el objeto.

La distribución del frente de ondas obtenida después del objeto, llamada onda de salida, está dada por la suma de la onda incidente y la onda dispersada como se muestra en la ecuación (4).

$$U_{salida}(x, y) = U_{incidente}(x, y) + U_{incidente}(x, y) * t(x, y) \quad (4)$$

En donde el primer término describe la onda de referencia R y el segundo la onda objeto O .

2.2.2.2 INTEGRAL DE FRESNEL-KIRCHHOFF Y OBTENCIÓN DEL HOLOGRAMA

La integral de Fresnel-Kirchhoff modeliza el fenómeno de propagación de la luz y predice los efectos de difracción cuando los ángulos son relativamente pequeños. La aproximación dada por la integral funciona mejor cuando la longitud de onda es del orden de la abertura y las observaciones se realizan relativamente lejos de esta [7,19].

La propagación de la onda hacia el sensor óptico se encuentra descrito por la ecuación (5).

$$U_{sensor}(X, Y) = -\frac{i}{\lambda} \iint U_{incidente}(x, y) \cdot t(x, y) \quad (5)$$

$$\times \frac{\exp(ik|\vec{r}(x,y,z) - \vec{R}(X,Y,Z)|)}{|\vec{r}(x,y,z) - \vec{R}(X,Y,Z)|} dx dy$$

Donde $|\vec{r} - \vec{R}|$ es la distancia entre un punto del plano objeto P_o y un punto en el plano del sensor óptico P_s . (Ver [Figura 2.4](#)).

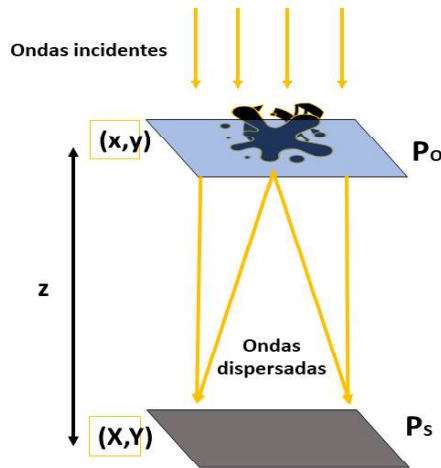


Figura 2. 4 Esquema holografía en línea con ondas planas. Configuración general de la dispersión de ondas planas en el sistema de geometría de transmisión.

El holograma obtenido en el plano del sensor se encuentra formado por la onda de referencia $R(X, Y)$ y por la onda objeto $O(X, Y)$. El módulo del mapa de intensidades registrado por la cámara está descrito en la ecuación (6) y (7) a continuación:

$$H(X, Y) = |U_{sensor}(X, Y)|^2 \quad (6)$$

$$H(X, Y) = |R(X, Y)|^2 + |O(X, Y)|^2 + R^*(X, Y)O(X, Y) + R(X, Y)O^*(X, Y) \quad (7)$$

El primer término $|R(X, Y)|^2$ es la constante de fondo debido al haz de luz solo. El segundo término es muy pequeño en relación con el primero por lo que se considera cero, $R^*(X, Y)$ y $O^*(X, Y)$ son las respectivas conjugadas de estos

términos. La información de la muestra en el interferograma se encuentra en los dos términos finales, ya que estos representan la interacción de las ondas dispersadas con las no dispersadas.

2.2.3 RECONSTRUCCIÓN DEL HOLOGRAMA EN AMPLITUD Y FASE

2.2.3.1 TRANSFORMADA DE FOURIER

La transformada de Fourier fue propuesta a inicios del siglo XIX por Joseph Fourier y se puede usar como una herramienta en el procesamiento digital de imágenes. La transformada recibe una imagen en el dominio espacial y devuelve una imagen en el dominio de frecuencias o dominio de Fourier [7,19]. (ver [Figura 2.5](#)). Mientras que, la transformada inversa de Fourier realiza el proceso inverso, recibe una imagen en el dominio de frecuencias y devuelve una imagen en el dominio espacial.

Sea $f(x, y)$ una función continua real. La transformada de Fourier en dos dimensiones se denota $F[f(x, y)] = F(u, v)$ y se define por:

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \exp(-i2\pi(ux + vy)) dx dy \quad (8)$$

Donde i es el número imaginario y u, v las variables de frecuencia.

Se puede hallar $f(x, y)$ usando la transformada inversa de Fourier sobre $F(u, v)$.

$$F^{-1}(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u, v) \exp(-i2\pi(ux + vy)) du dv \quad (9)$$

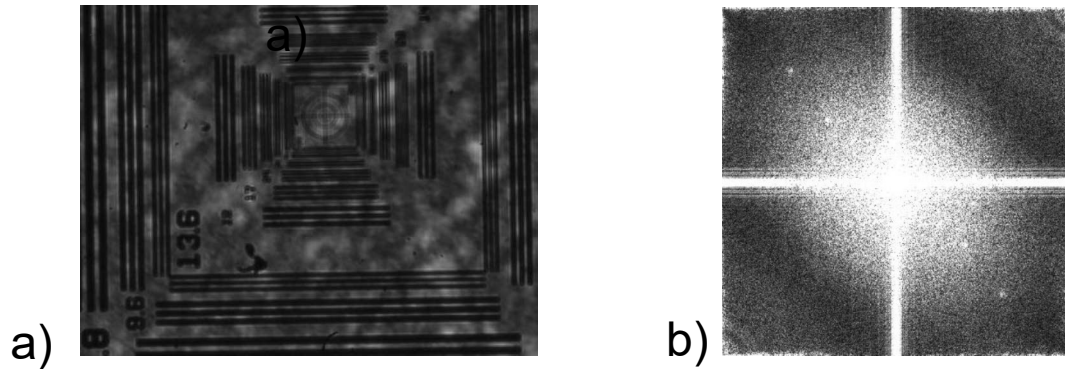


Figura 2. 5 Transformada de Fourier. a) Holograma original grabado con el sistema en línea.
b) Imagen en el dominio de Fourier.

2.2.3.2 VENTANA DE HANN EN EL DOMINIO DE FOURIER

Los filtros en el dominio espacial por lo general se encargan de eliminar información de bordes y “suavizan” la imagen. En el dominio de Fourier se puede filtrar un gran rango de frecuencias eliminando así ruido innecesario sin perder información importante de la imagen [23,24]. Los filtros típicamente usados en el espacio de frecuencias son: pasa bajo, pasa alto y pasa banda; que tienen por función cortar la frecuencia con una función escalera perdiendo así partes claves y mostrando en los bordes de la imagen líneas atípicas a consecuencia de esto [25]. La ventana de Hann es un filtro en forma de campana que elimina frecuencias mediante un cambio suave, preservando información importante y eliminando frecuencias no deseadas e interferencias producidas por el propio filtro en los bordes.

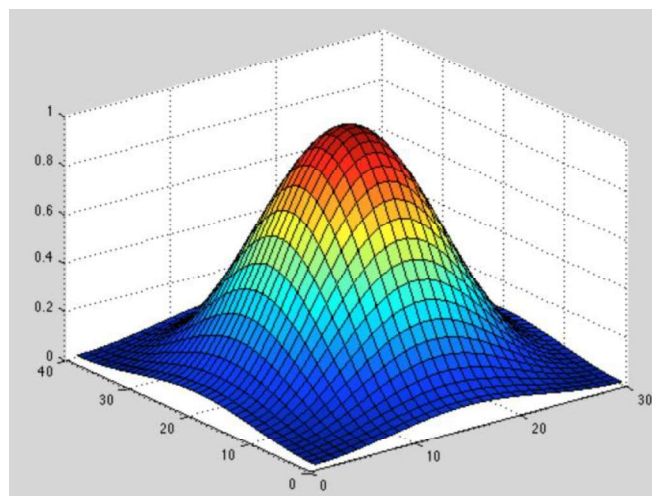


Figura 2. 6 Ventana de Hann. Campana que filtra las frecuencias de la imagen en el espacio de Fourier

2.2.3.3 MÉTODO DEL ESPECTRO ANGULAR

Cuando una fuente monocromática de ondas planas incide sobre un objeto modificando su amplitud A y su fase Φ [26], ambas son función sobre el frente de onda produciendo una nueva amplitud compleja que es representada por la ecuación (10)

$$f(X, Y) = A(X, Y) \exp(i\Phi(X, Y)) \quad (10)$$

Es conveniente considerar esta onda como una serie de ondas planas infinitas que viajan en diferentes direcciones, este conjunto de ondas se conoce como el espectro angular del campo y se encuentra relacionado con $f(X, Y)$ mediante una transformada de Fourier, como detalla Ratcliffe [26].

Cada onda viaja en su propia dirección y llegará a cierto punto en el plano paralelo al plano de difracciones, la onda plana incide con su fase que depende de su dirección y el ensamble crea una amplitud de ondas complejas que corresponde a la distribución con ángulo en el espectro angular. La amplitud de cualquier punto del plano paralelo puede ser calculado agregando las contribuciones de estas ondas planas, teniendo en cuenta de los cambios de fase que han sufrido durante la propagación [7].

Suponiendo un sistema con una fuente monocromática con sus componentes de propagación en dirección z positivo, transversal al plano (x, y) , con campo complejo inicial $U(X, Y, 0)$ con origen en $z = 0$. El objetivo final es calcular el campo resultante $U(X, Y, Z)$ que aparece en un segundo plano paralelo a una distancia z a la derecha del primer plano [26]. El espectro angular de la distribución $U(X, Y, 0)$ (detallado en Goodman [7]) sería:

$$A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0\right) = \iint_{-\infty}^{+\infty} U(X, Y, 0) \exp\left[-2\pi i\left(\frac{\alpha}{\lambda}x + \frac{\beta}{\lambda}y\right)\right] dx dy \quad (11)$$

Donde α, β son los cosenos directores del vector de onda \vec{K} y $\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}$ son las frecuencias espaciales de la amplitud compleja.

Considerando ahora el espectro angular de U a través de un plano paralelo al plano (x,y) a una distancia z , se escribe de la siguiente manera:

$$U(X, Y, Z) = \iint_{-\infty}^{+\infty} A\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, Z\right) \exp\left[2\pi i\left(\frac{\alpha}{\lambda}x + \frac{\beta}{\lambda}y\right)\right] d\frac{\alpha}{\lambda} d\frac{\beta}{\lambda} \quad (12)$$

U debe satisfacer la ecuación de Helmholtz [7]:

$$\nabla^2 U + k^2 U = 0 \quad (13)$$

Obteniendo la solución a la ecuación (13) se tiene la condición para el espectro angular en la que los cosenos directores α, β deben satisfacer:

$$\alpha^2 + \beta^2 \leq 1 \quad (14)$$

2.2.3.4 PROPAGACIÓN DEL ESPECTRO ANGULAR

El método del espectro angular no usa ninguna aproximación, ya que, se basa en el hecho que la propagación de ondas planas puede ser descrita por la propagación de su espectro [20,26].

El holograma obtenido en el sensor puede ser calculado mediante la transformación en el espacio de Fourier como se muestra en la ecuación (12).

$$\begin{aligned}
U_{sensor}(X, Y) &= FT^{-1} \left[FT(t(x, y)) \right. \\
&\quad \left. \times \exp \left(\frac{2\pi iz}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda\alpha)^2 - (\lambda\beta)^2} \right) \right]
\end{aligned} \tag{15}$$

Donde $\exp \left(\frac{2\pi iz}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda\alpha)^2 - (\lambda\beta)^2} \right)$ es el término propagador del espectro, z es la distancia que recorre en el eje z , α, β los cosenos directores y FT^{-1}, FT la transformada inversa y transformada de Fourier respectivamente. La reconstrucción del holograma consiste en el propagador viajando la misma distancia z en dirección opuesta:

$$\begin{aligned}
U_{imagen}(X, Y) &= FT^{-1} [FT(H(X, Y)) \\
&\quad \times \exp \left(-\frac{2\pi iz}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda\alpha)^2 - (\lambda\beta)^2} \right)]
\end{aligned} \tag{16}$$

Donde el signo negativo en el término propagador indica el camino inverso de las ondas.

3 METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES

En este proyecto se utilizaron los siguientes, materiales y programas:

- Láser 532 nm, 200mW.
- Diodos LED, 3mm.
- Pin-Hole 200nm.
- Raspberry pi Zero W.
- Camera Module for Raspberry Pi Zero, Adafruit 5MP.
- Impresora de filamento Anet A8.
- Rollo de filamento PLA de 1.75mm.
- Impresora de resina FormLabs 1+.
- Resina negra RS-F2-GPBK-04.
- Microscopio Motic BA310.
- Ordenador
- Espectrómetro HR4000CG-UV-NIR, Ocean Optics, FL.
- L3CMOS Series C-mount USB3.0 CMOS Camera.
- DMM 37UX273-ML USB 3.1 monochrome board camera.
- Mesa óptica Thorlabs.
- Soportes, postes, estructuras para mesa óptica.
- Blanco de prueba “NBS 1952 Resolution Test Target 3” x 1””
- Micropartículas poliestireno, 2.6 μ m.
- Muestra de Tuberculosis.
- Alas de Polilla.
- Muestra de Tallo de Calabaza.
- Isopropanol
- MatLab R2018b.
- Linux, sistema operativo Raspbian.
- tightVNC Viewer
- ImageJ

3.2 PRUEBA DE INSTRUMENTOS

La evaluación de los instrumentos se realizó de la siguiente manera.

1. Se determinó la fuente de luz que mejor se adapte a la geometría de transmisión del sistema, para esto se midió la intensidad y longitud de onda. La fuente de luz debe ser lo suficientemente coherente después de pasar el pin-hole para generar un mapa de interferencias en el sensor. Se midió las longitudes de onda con el espectrómetro HR4000CG-UV-NIR, Ocean Optics, obteniendo un pico definido para los láseres y un $\Delta\lambda$ para los diodos LED. Debido a que la longitud de onda es una variable en la reconstrucción numérica se optó por usar un láser como fuente de luz. Se realizaron grabaciones con las distintas fuentes obteniendo una mejor coherencia y una imagen directiva más definida con el láser de 532 nm.
2. Para la selección del sensor óptico se tomaron en cuenta ciertos parámetros como:
 - Software: La cámara de Raspberry pi Zero W al conectarse al sistema Raspbian que trabaja con una interfaz de Python puede interactuar de mejor manera para un preprocesamiento de imagen y acceso desde MatLab R2018b. Los dos sensores ópticos restantes trabajan con su propio software no libre con las limitaciones de este y con la restricción que no se puede controlar desde otro programa.
 - Diseño del sensor: Debido a que se desea realizar un sistema portable, el tamaño de la placa sobre la cual se encuentra montado es clave, además de que tan cerca se encuentren los componentes electrónicos del sensor y su tamaño, ya que se requiere acercar lo más posible la muestra al sensor.

Los demás parámetros se presentan en la [Tabla 3.1](#)

Tabla 3. 1 Comparación entre tres tipos de sensores CMOS

Sensor	Camera Module for Raspberry	L3CMOS Series	DMM 37UX273-ML
Área Activa	3.76 × 2.74mm	5.56 x 4.26mm	4.97 x 4.97mm
Tamaño de Pixel	1.4 μm × 1.4 μm	1.67 μm x 1.67 μm	3.45 μm × 3.45 μm
Resolución del Sensor	2592x1944	3328x2548	1,440×1,080
Tamaño del circuito y la cámara	60 x 11.4 x 5.1mm	80 x 80 x 45mm	30 x 30 x 15mm
Peso	1.1g	8.8g	7g
Relación S/N	36 dB	65.2 dB	48 dB
Precio	~ \$12	~ \$350	~ \$398

Teniendo en cuenta todas las características antes mencionadas se tomó como mejor opción el uso del *Camera Module for Raspberry Pi Zero* como sensor óptico para el sistema.

3.3 MONTAJE DEL SISTEMA EN LÍNEA Y OBTENCIÓN DEL INTERFEROGRAMA

Para el montaje del sistema en línea se procedió a ubicar sobre la mesa óptica, las partes constitutivas del sistema. El láser, el pin-hole, la muestra y el sensor como se observa en la [Figura 3.1](#). Se quitó manualmente el lente que viene de fábrica en la cámara del Raspberry para dejar descubierto el sensor CMOS. Se midió la longitud de onda exacta del láser con el espectrómetro HR4000CG-UV-NIR de Ocean Optics, $\lambda = 532.0 \text{ nm}$. Se alineó apuntando sobre el pin-hole que se posicionó a una distancia $Z_2 = 2.5 \text{ cm}$ de la muestra. La muestra se ubicó a distancia $Z_1 \sim 1 \text{ mm}$ del sensor óptico del Raspberry.

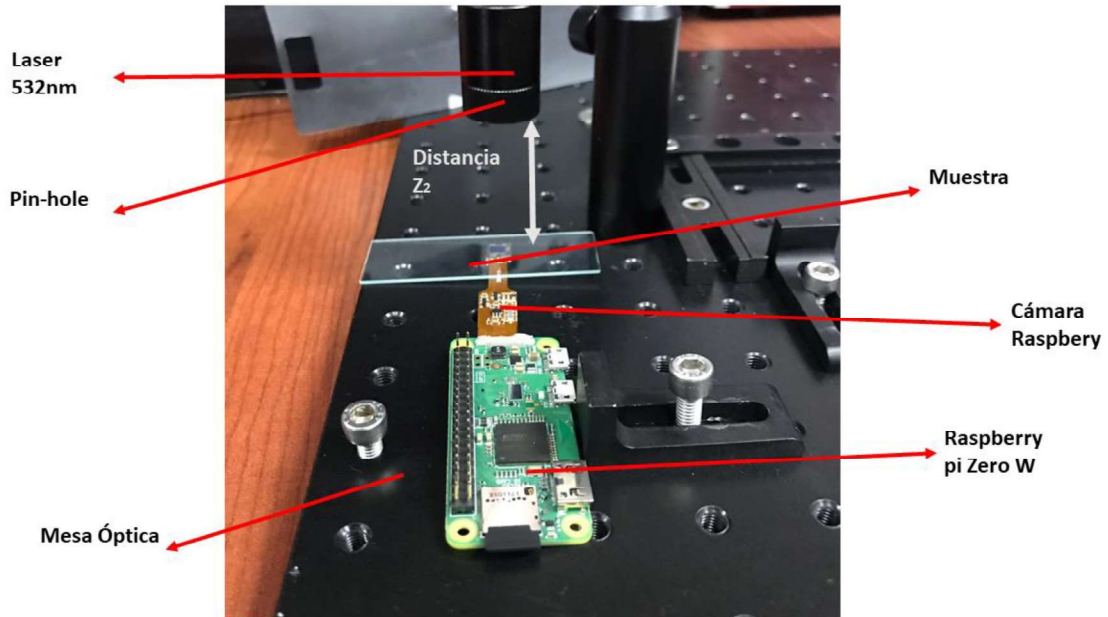


Figura 3. 1 Montaje del sistema en línea. Se observa el prototipo de montaje del microscopio sin lentes en geometría de transmisión.

Para la comunicación entre el Raspberry y el pc se probaron dos métodos.

1. El Raspberry actuó como dispositivo local y fue controlado a distancia desde un ordenador remoto mediante el programa *tightVNC Viewer*, el cual necesita configuraciones tanto para la tarjeta electrónica como para el dispositivo remoto. El registro de imágenes difractivas fue controlada mediante un comando desde el terminal del sistema operativo *Raspbian* del Raspberry Pi Zero W. Una vez obtenida la imagen se envió al ordenador remoto para su posterior procesamiento.
2. Desde el programa MatLab R2018b, se procedió a instalar y configurar el paquete *Soporte de MATLAB para Raspberry Pi* que permite la configuración directa con el Raspberry Pi Zero W mediante protocolo TCP/IP, que es el conjunto de protocolos de comunicaciones utilizados en Internet y redes informáticas. Se procedió a crear un código que controló la cámara, [Anexo1](#). La imagen obtenida es directamente importada a MatLab.

Se escogió el segundo método, ya que no necesita de programas adicionales a MatLabR2018b, además de que el paquete necesario para la comunicación es de fácil instalación. La imagen es recibida directamente en la interfaz del programa, agilizando así el registro y tratamiento del interferograma.

Con el objetivo de reducir los tiempos de procesamiento en el software (2 minutos vs ~ 15 segundos), se optó por reducir la resolución de la cámara de 2592x1944 a 1280x720 píxeles. El esquema final se representa en la [Figura 3.2](#).

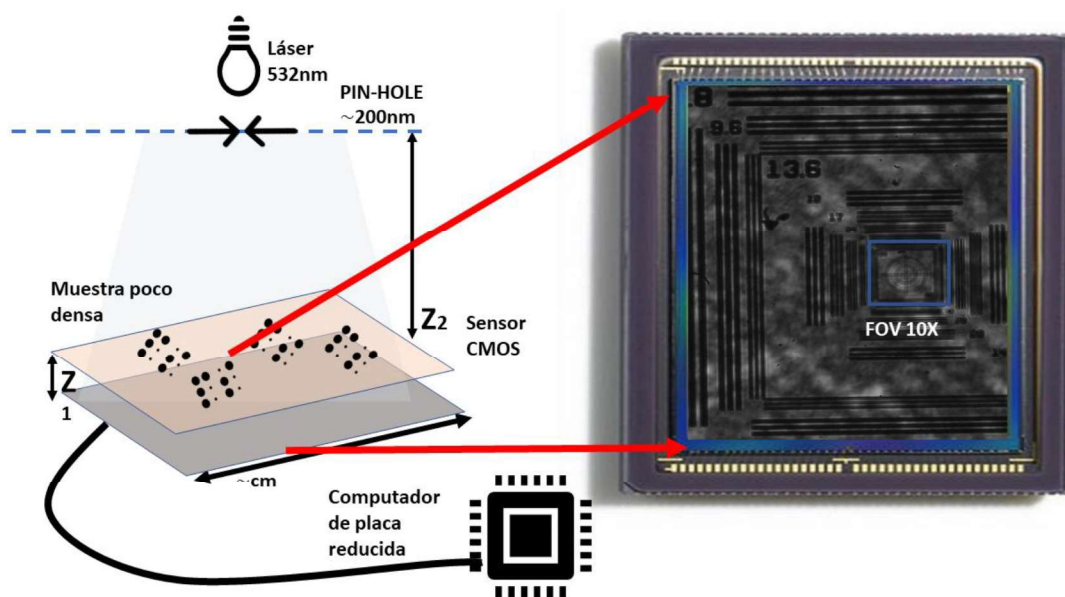


Figura 3. 2 Esquema sistema en línea. Se observa el esquema de holografía sin lentes en geometría de transmisión con un sensor CMOS controlado por una tarjeta electrónica (Raspberry). A la derecha se observa un ejemplo de interferograma y se compara en el recuadro azul con el campo de visión de un microscopio tradicional con un aumento de 10X.

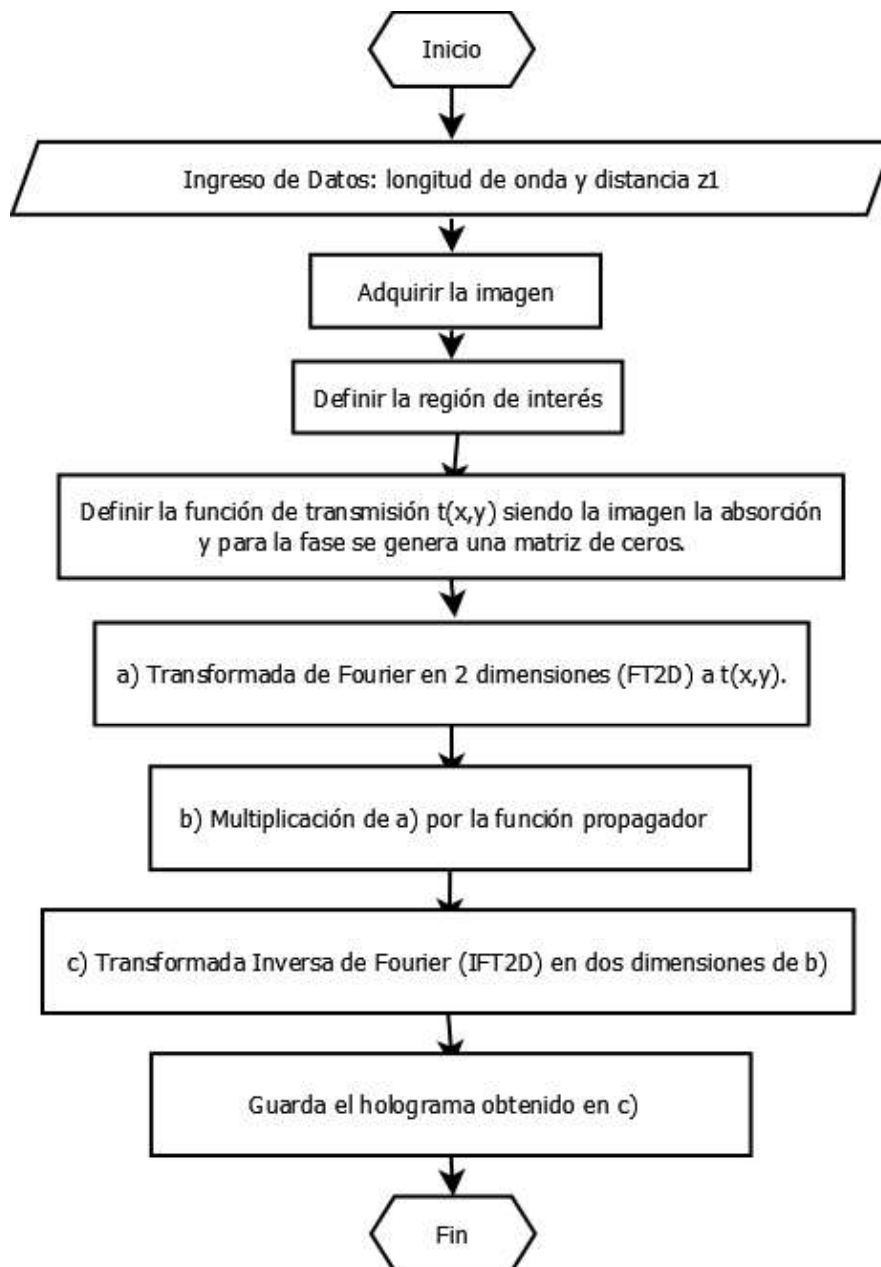
La reconstrucción numérica de la imagen es un proceso central para este proyecto por lo que se describe detalladamente en el capítulo siguiente.

4 RECONSTRUCCIÓN NUMÉRICA DE LA IMAGEN

4.1 SIMULACIÓN DEL HOLOGRAMA

El interferograma que se obtendría con el sistema en línea propuesto fue simulado mediante la propagación de ondas planas en el espectro angular. Se realizó esta simulación para evaluar el correcto funcionamiento del programa de reconstrucción numérica del mapa de interferencias.

El algoritmo usado se presenta a continuación:



El código se encuentra en el [Anexo2](#).

Se realizó una imagen ([Figura 3.3](#)) de dimensión 500 x 500 píxeles que emula ciertas muestras, como son cuerpos delgados y alargados, partículas juntas y cuerpos uno dentro del otro. Se simuló, con el algoritmo antes descrito, con distintas distancias Z_1 , $\lambda = 532nm$ obteniéndose las siguientes imágenes mostradas en la [Tabla 3.2](#)

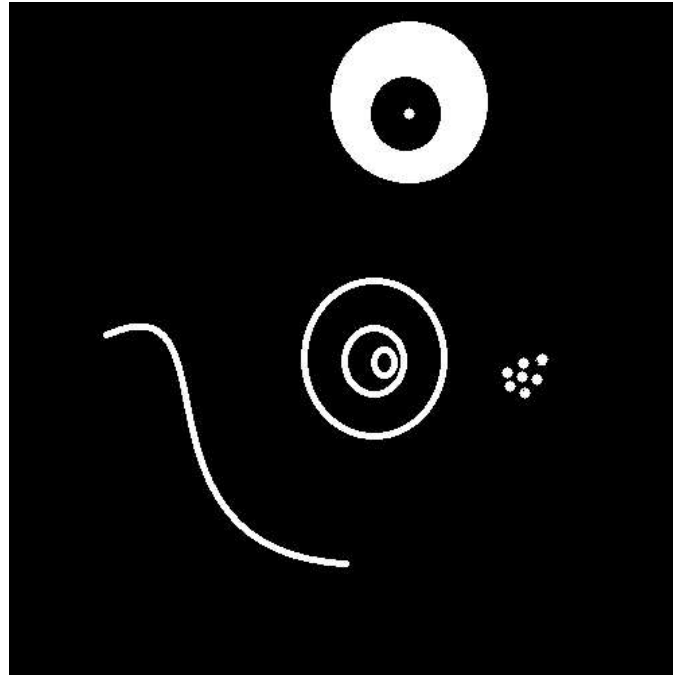
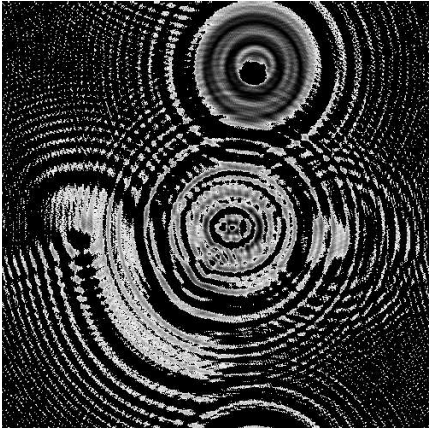
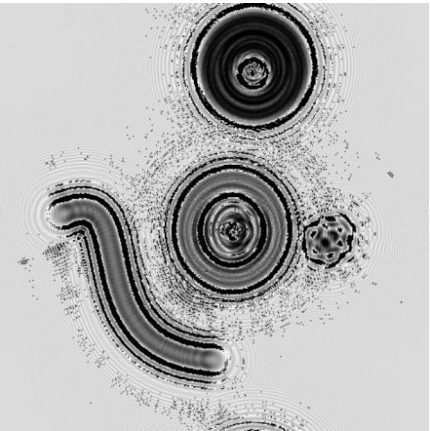
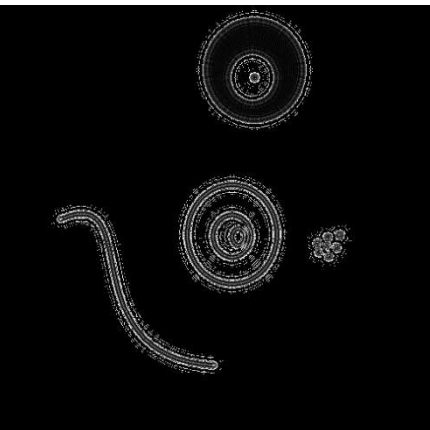


Figura 3. 3 Muestra de prueba. Imagen para simular la propagación e interacción de las ondas hasta obtener el interferograma.

Tabla 3. 2 Hologramas Simulados. Hologramas obtenidos por simulación con distinto valor de z_1

z_1	Holograma
100mm	

50mm	
10mm	
1mm	

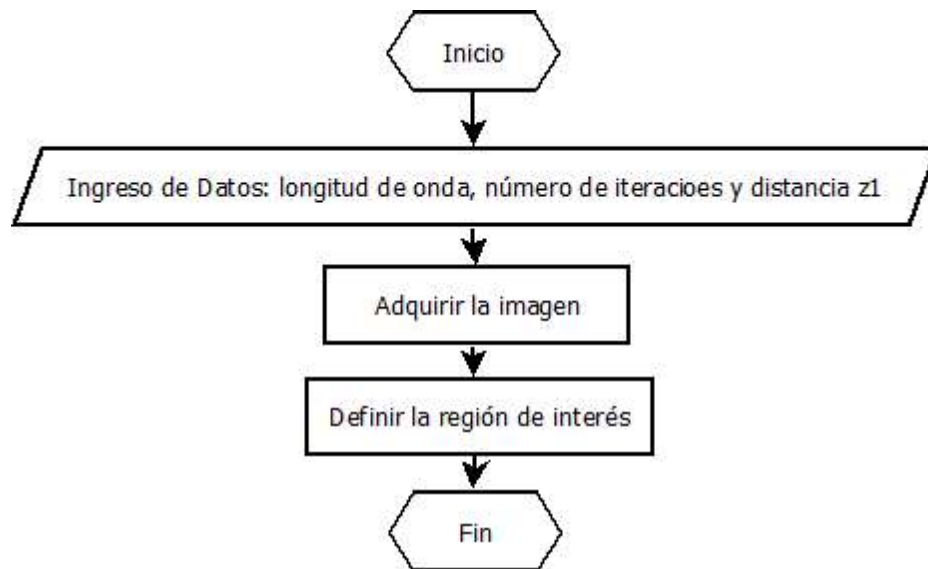
4.2 RECONSTRUCCIÓN NUMÉRICA

La reconstrucción numérica del holograma para obtención de información en amplitud y fase de la muestra se realizó mediante el método del espectro angular, ya que éste método es el único que no usa ninguna aproximación como se explicó en la teoría, además de que solo depende de la longitud de onda y de la distancia z_1 puesto que la muestra al estar prácticamente sobre el sensor, el tamaño de pixel deja de ser una variable en la reconstrucción numérica, pero si

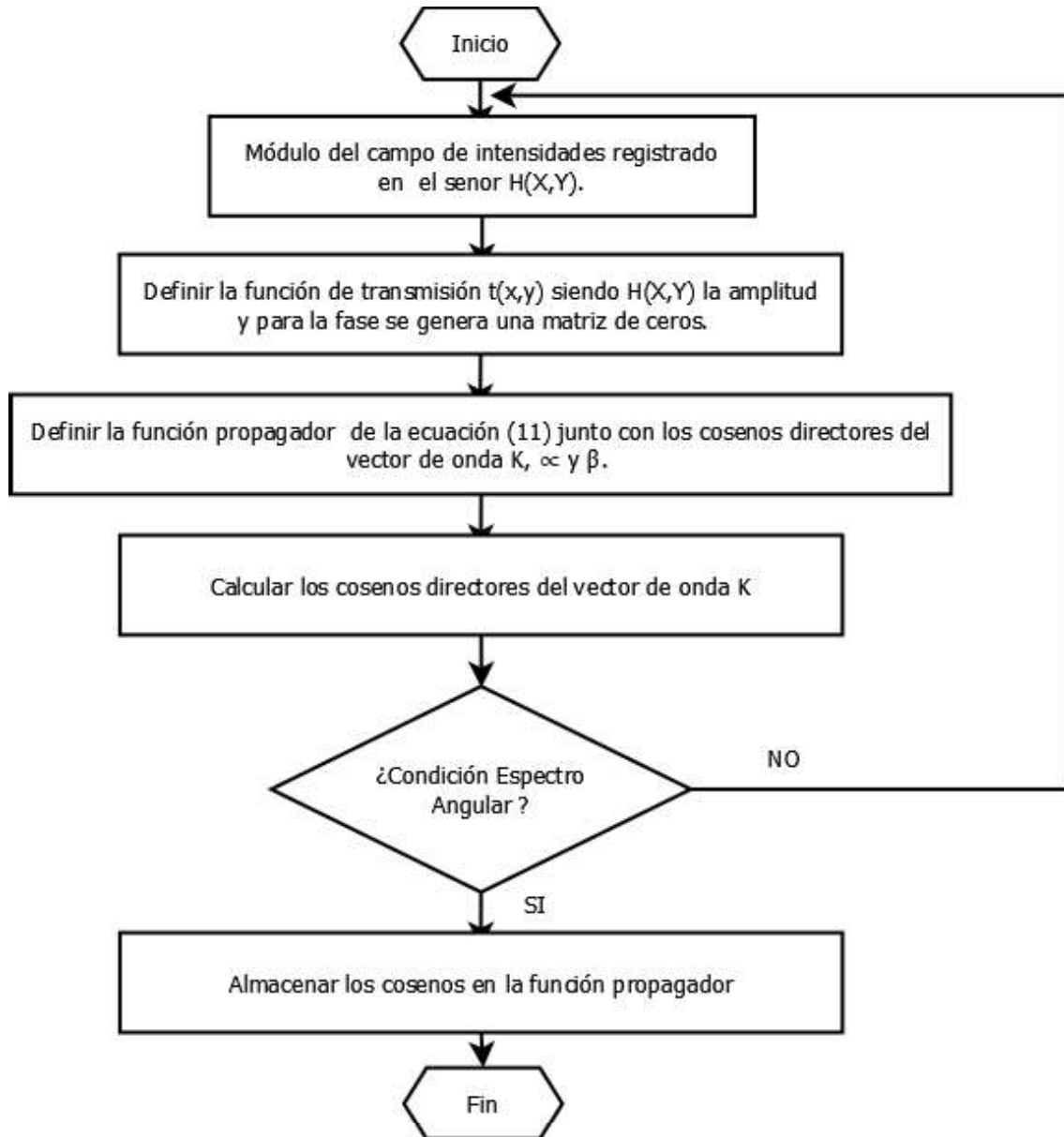
una variable para las dimensiones en el programa y es clave solo en la precisión de la imagen. Debido a que la distancia $z_2 \gg z_1$ no existe problema en trabajar con ondas planas.

El algoritmo usado se presenta en los 4 procesos siguientes:

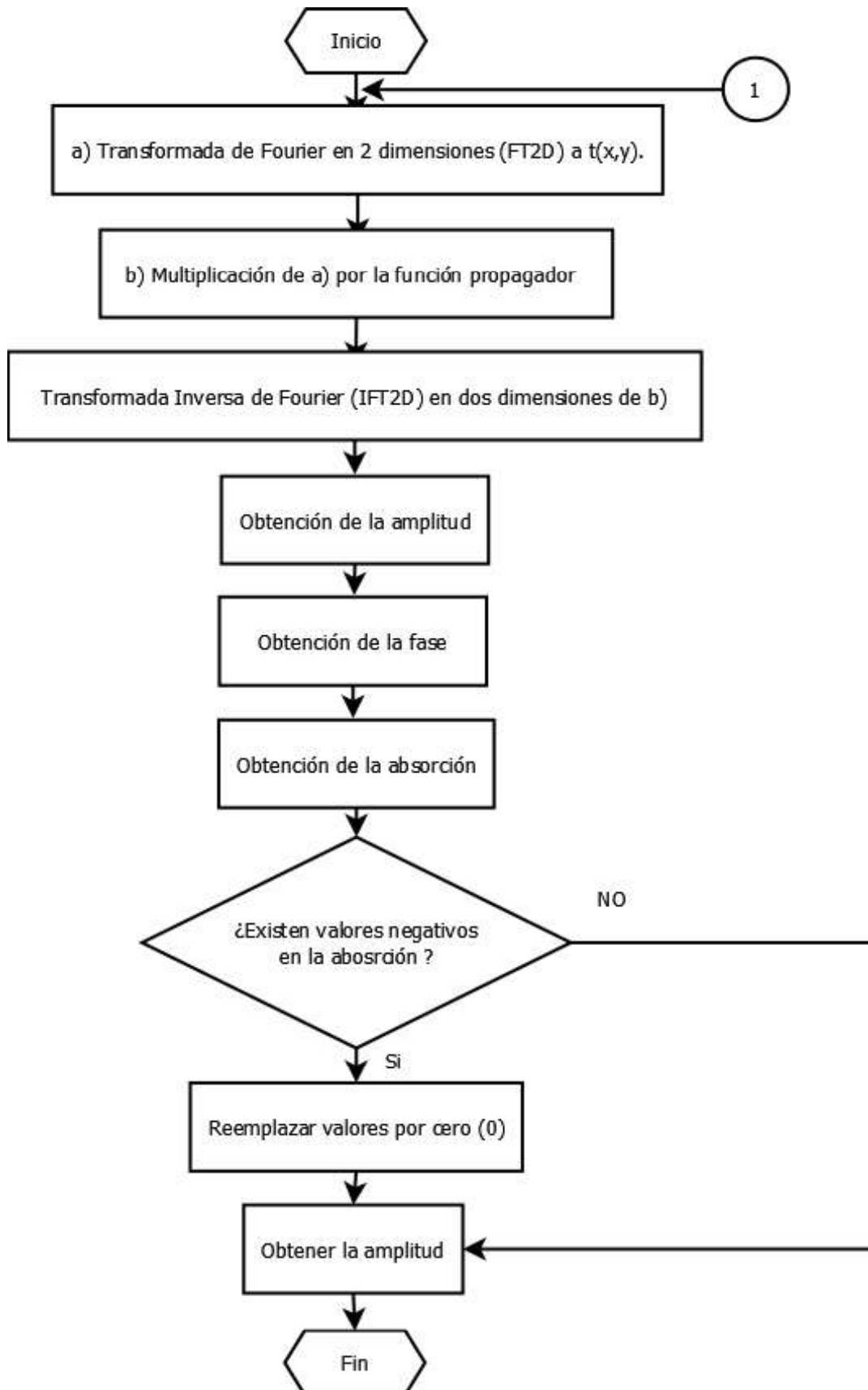
1. Ingreso de datos y selección de región de interés



2. Definición de funciones de transmisión y propagador. Condición de espectro angular.

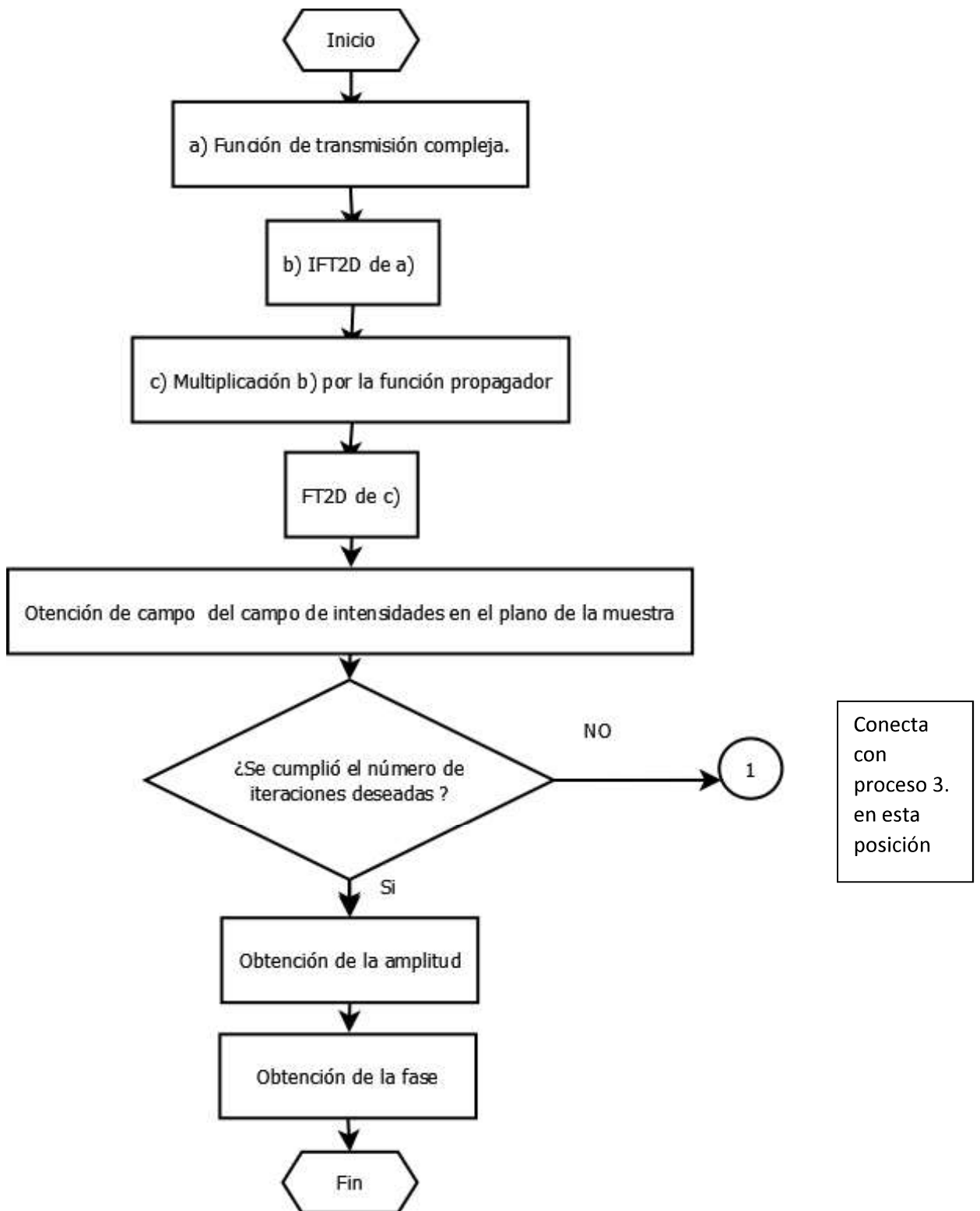


3. Multiplicación del propagador en el espacio de Fourier y obtención de la amplitud del interferograma.



Conecta con proceso 4. en esta posición

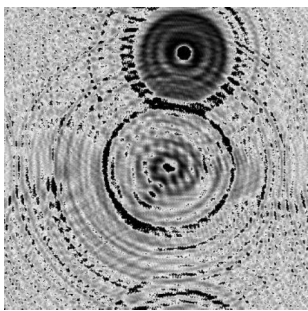
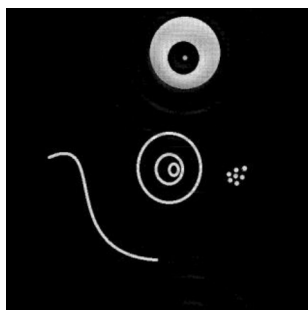
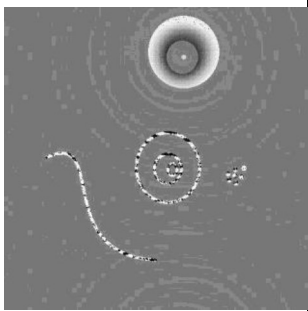
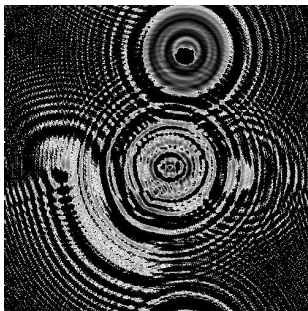
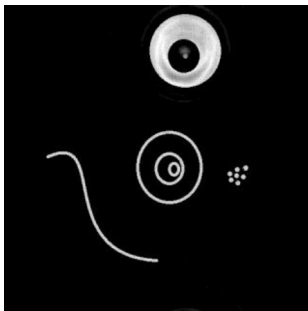
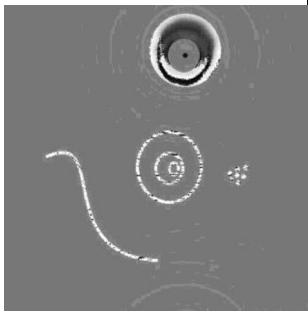
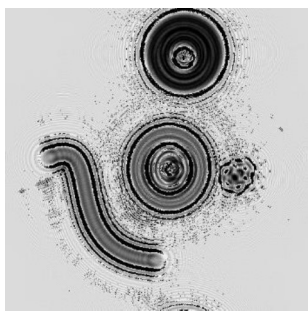
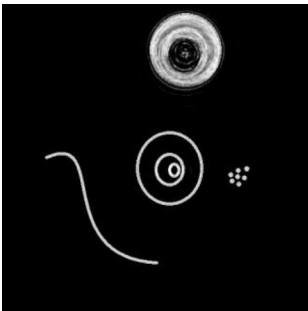
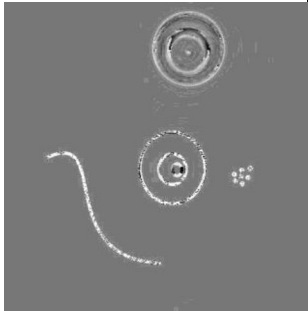
4. Obtención de la amplitud y fase de la muestra

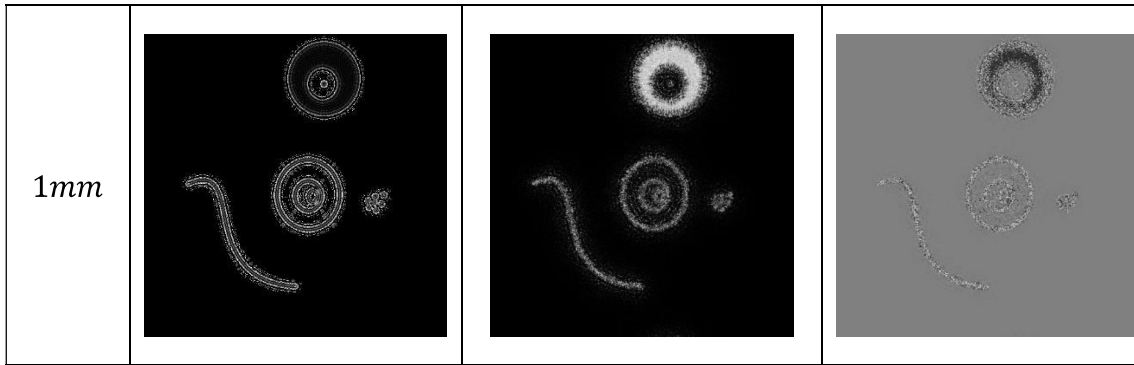


El código se encuentra en el [Anexo3](#).

Para la reconstrucción numérica se tomaron las mismas variables de la simulación Z_1 y $\lambda = 532nm$, obteniendo las siguientes imágenes mostradas en la [Tabla 3.3](#)

Tabla 3. 3 **Reconstrucción Numérica.** Reconstrucción numérica en amplitud y fase de los hologramas obtenidos por simulación con distinto valor de z_1

z_1	Holograma	Amplitud Reconstruida	Fase Reconstruida
100mm			
50mm			
10mm			



Como se observa en las figuras el código funcionó para la reconstrucción de hologramas simulados, por lo que se procedió a las pruebas en hologramas captados con el sensor óptico.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 IMPLEMENTACIÓN DEL DISPOSITIVO

5.1.1 CONSTRUCCIÓN DE PARTES POR IMPRESIÓN 3D

El modelamiento para la posterior impresión en 3D se realizó mediante una herramienta en línea Tinkercad, que es un software que permite la creación de diseños 3D mediante la suma y resta de figuras geométricas preestablecidas.

El diseño debe ser compacto, robusto y adaptado de tal manera que los soportes necesarios para sostener el sólido no afecten la obtención del interferograma en el sensor óptico. Además, debe poder acoplar las partes constitutivas del sistema en geometría de transmisión.

El láser, el pin-hole, la muestra y el sensor óptico del Raspberry se ubicaron en el mismo eje óptico y se usaron las distancias teóricas $Z_2 = 2.5cm$ y $Z_1 \sim 1mm$. Para el soporte del Raspberry pi Zero w se usó un diseño estándar tomado de la página web thingiverse.com y se juntó al sistema en línea como se observa en la [Figura 3.4](#).

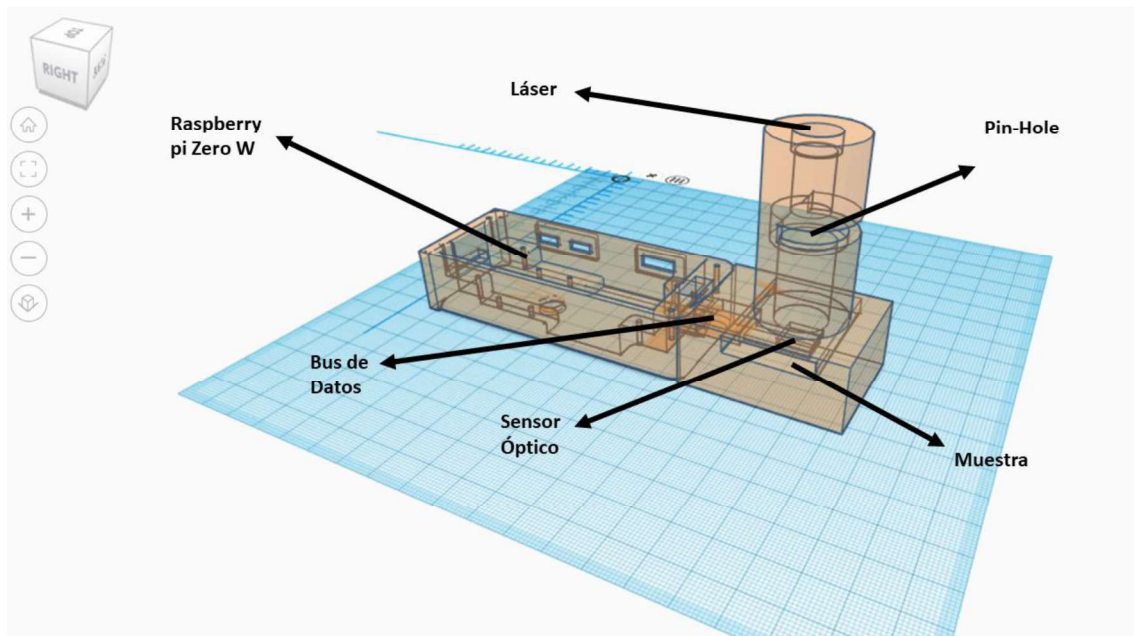


Figura 3. 4 Diseño 3D. Se presenta el sistema de microscopía holográfica en línea reducido, señalado el lugar en donde van las distintas partes constitutivas,

La impresión se realizó mediante dos técnicas diferentes. Fused Deposition Modeling) (FDM) trabaja con una boquilla exclusora que se mueve en los ejes X, Y, Z y va depositando y solidificando el filamento sobre una cama de metal, es la tecnología más económica y usa materiales plásticos biodegradables como el PLA. La precisión viene dada por el tamaño de la boquilla de extrusión y de los movimientos de este en los ejes XY. Nuestro sistema trabaja con el programa Ultimaker CURA 3.60 que permite configurar los parámetros de impresión como son espesor de las paredes, densidad, patrón de relleno etc.

Para este caso se usó una impresora 3D ANET A8 con la siguiente configuración en su impresión mostrada en la [Tabla 3.4](#).

Tabla 3. 4 Configuración impresora Anet A8.

Altura de la capa	0.1mm
Densidad de relleno	30%
Patrón de relleno	Octeto
Temperatura de Impresión	220 °C
Temperatura de cama	65 °C
Velocidad de Impresión	65 mm/s
Generar Soportes	Si
Lugar de Soportes	En todas partes

La tecnología estereolitografía (SLA), trabaja con un láser que solidifica la resina sobre una plataforma elevada en el punto de enfoque, esta impresión es mucho más precisa y de mejor calidad, además de que el sólido formado tiene una densidad superior al 80%, pero su costo es más elevado que la FDM. A diferencia de la tecnología FDM que no necesita tratamiento del sólido después de la impresión, se necesita limpiar la pieza en 2-propanol además del cuidado que se debe tener con el tanque y la resina ya que esta se solidifica al ser expuesta a luz. El software que usa para la impresión es PreForm y se configura de forma automática al detectar que la impresora se encuentra conectada al computador.

5.1.2 CALIBRACIÓN

La calibración del sistema reducido es clave para la obtención del interferograma en el sensor óptico, para esto se usó el proceso siguiente:

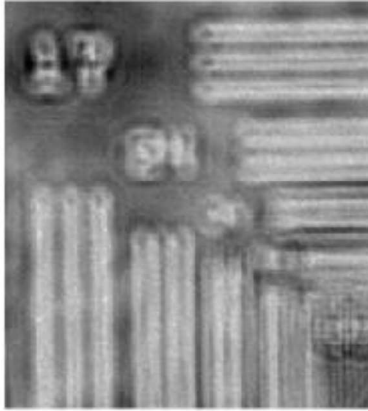
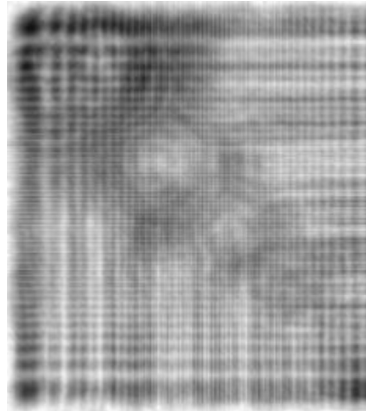
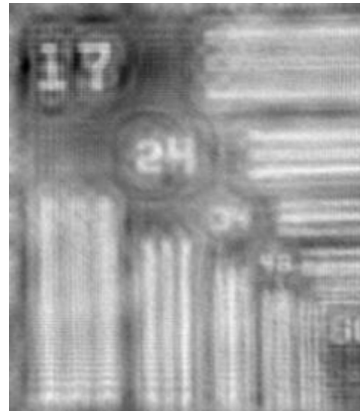
- a) Se fijó el sensor óptico a la estructura 3D.
- b) Se colocó el blanco de prueba blanco de prueba “NBS 1952 Resolution Test Target 3” x 1”” sobre la estructura a una distancia $z_1 \sim 1mm$
- c) Se ubicó el pin-hole en espacio impreso a $\sim 2.5cm$ de la muestra.
- d) El láser se ubica sobre todo el sistema en el mismo eje óptico, de tal manera que su haz pase por el centro del pin-hole formando un lápiz luminoso perpendicular al sensor.
- e) Una vez fijas las partes constitutivas se procede a ejecutar una variación del programa de reconstrucción mostrado en el [Anexo3](#), cambiando el z_1 fijo por un valor que recorra un intervalo superior e inferior para buscar así el valor de calibración y enfoque, la variación del código se encuentra en el [Anexo4](#).

Es importante notar que una vez ubicadas las piezas en el eje óptico, éstas deben fijarse como señala el manual en el [Anexo7](#), teniendo como única parte móvil a la muestra. Se usa como muestra el blanco de prueba “NBS 1952 Resolution Test Target 3” x 1”” ya que éste posee dimensiones conocidas[28], por lo que se puede probar la resolución del sistema. Además, el blanco de prueba posee números por lo que se sabe cuál debe ser el resultado buscado. En cuanto a la distancia entre el sensor y la muestra z_1 , debido a razones propias en el hardware de cada una de las impresoras, el resultado final en la impresión no mantiene la resolución ofrecida en la etapa de diseño de componentes, por lo que se debe variar la distancia del sensor a la muestra en el programa en pasos menores a $1mm$, buscando el valor que “enfoca” la muestra de mejor manera (Ver [Tabla3.5](#)).

El láser fue alimentado con 3,3V desde el Raspberry Pi Zero W conectando los GPIO 1 y 5 al polo positivo y negativo respectivamente, se usó un cargador

reciclado de celular Nokia, que posee un conector mini USB tipo-B que otorga 5,6 V medidos con un multímetro y una corriente de 160 mA.

Tabla 3. 5 Calibración del sistema. Reconstrucción numérica en amplitud para z_1 no calibrado y calibrado respectivamente

Amplitud del Holograma	Amplitud Reconstruida no calibrado z	Amplitud Reconstruida $z_1 = 0.69\text{mm}$
		

Después de realizar pruebas variando la distancia z_1 en un intervalo entre 0.00mm y 1.5mm, se observó que la distancia que mejor resultados entregaba en la imagen reconstruida, y que fue tomada como una distancia de calibración del sistema fue z_1 de 0.69 mm

5.1.3 PRE-PROCESAMIENTO DE IMAGEN

El interferograma obtenido en el sensor óptico puede ser mejorado previo a la reconstrucción numérica. Como se mencionó en la sección [2.2.2.2](#) en la ecuación (4), el mapa de interferencias depende de los términos $R^*(X,Y)O(X,Y) + R(X,Y)O^*(X,Y)$ entonces se puede intentar eliminar las onda de referencia pura $R(X,Y)$. El haz de referencia $R(X,Y)$ se obtiene de la luz no dispersada por la muestra, pero no solo se limita restar el haz de referencia puro, ya que al pasar por el pin-hole el haz de luz sufre dispersión y genera un interferograma secundario, además el portaobjetos sobre el cual se coloca la muestra afecta a la imagen de interferograma registrado en el sensor. Para mejorar la muestra se procedió a tomar una imagen del mapa de interferencias creado del sistema sin muestra, incluyendo el portaobjetos, y se restó digitalmente del interferograma con la muestra. Debido a que el ruido o "speckle" producido por el portaobjetos es distinto cada vez que se realiza la medición, y a lo sensible que es la interferencia producida por luz coherente restar la imagen elimina información

importante para la reconstrucción dejando la imagen en negro, como se observa en la [Tabla 3.6](#)

Tabla 3. 6 Preprocesamiento. Resta del haz de referencia.

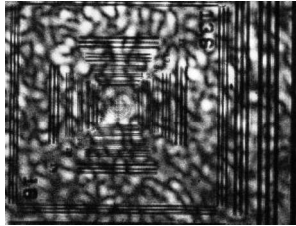
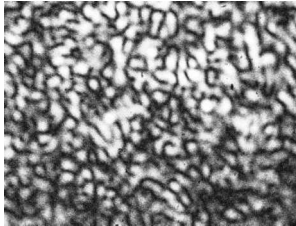

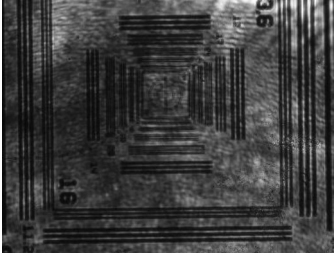
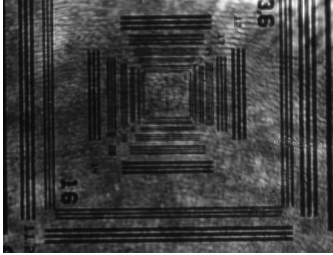
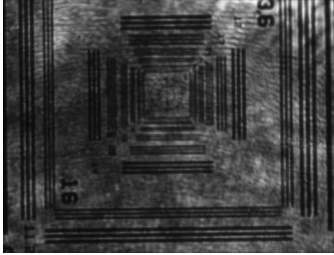
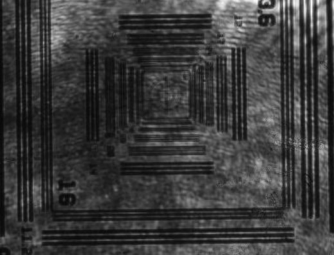
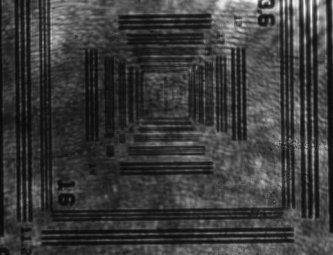

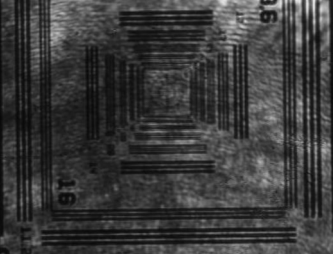


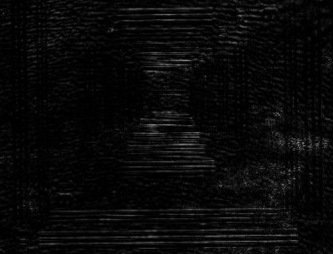
Imagen Original	Imagen sin Muestra	Imagen "Restada"
		

Tabla 3. 7 Filtros de Imagen. Filtros de imagen proporcionados por MatLabR2018b.

Imagen Original	Filtro Mediana	Filtro Disk	Filtro Promedio	Filtro Gaussiano
				
Filtro Laplaciano	Filtro de Movimiento	Filtro Logaritmico	Filtro Prewitt	Filtro Sobel
				

En la [Tabla 3.7](#) se observa el cambio del holograma al usar varios filtros, los cuales fueron implementados usando el software, MatLab2018Rb. Si bien los filtros implementados, a simple vista, no añaden características que mejoren la resolución de la imagen final obtenida, pueden eliminar características importantes dentro de los bordes, necesarias para el procesamiento posterior; además la implementación de los mismos consumirá tiempo y recursos de hardware que pueden ser innecesarios.

Se optó entonces por usar un filtro en el espacio de Fourier. Debido a que estos filtros se encargan de eliminar o resaltar ciertos intervalos de frecuencias según se necesite. De esta forma se empleó un filtrado mediante enventanado, específicamente el método escogido fue ventana de Hann (Ver [Figura 3.5](#)), mostrado en la sección [2.2.3.2](#), que a diferencia de los filtros típicos pasa bajo, pasa alto o banda que en sus bordes es una función escalonada, este filtro cae suavemente formando una campana, eliminando las frecuencias altas típicas de los bordes y transiciones bruscas, elimina el efecto de difusión en una imagen, y es típico para eliminar ruido.

El código para el filtro se encuentra en el [Anexo 6](#).

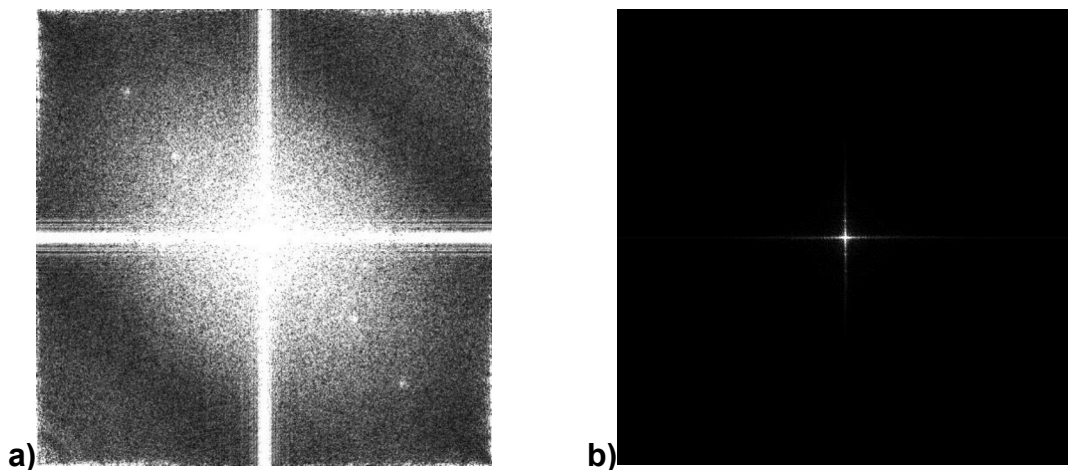


Figura 3. 5 Ventana de Hann. a) Se observa el espacio de Fourier sin filtro. b) Filtrado de las frecuencias mediante la ventana de Hann.

5.2 APLICACIÓN ITERATIVA EJECUTABLE

Los códigos usados fueron agrupados en un ejecutable que permite procesar los interferogramas sin la necesidad de acceder al código base. Se realizó una interfaz mediante la herramienta de Matlab, Guide.

Cada botón, ventana, cuadro, eje, etc es asignado a una parte del código que se desea ejecutar, permitiendo un control mayor sobre el programa.

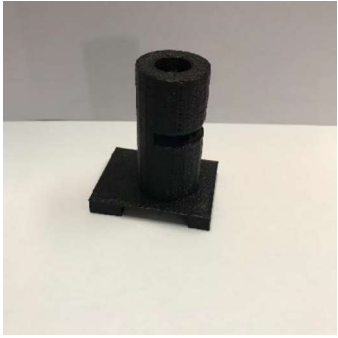

Debido a que la conexión mediante Matlab no permite observar en tiempo real lo que el sensor óptico registra, se incorporó un código que muestra capturas en línea de las imágenes que adquiere el sensor óptico hasta que el usuario desee guardar el interferograma para la posterior reconstrucción, el código se encuentra en el [Anexo5](#).

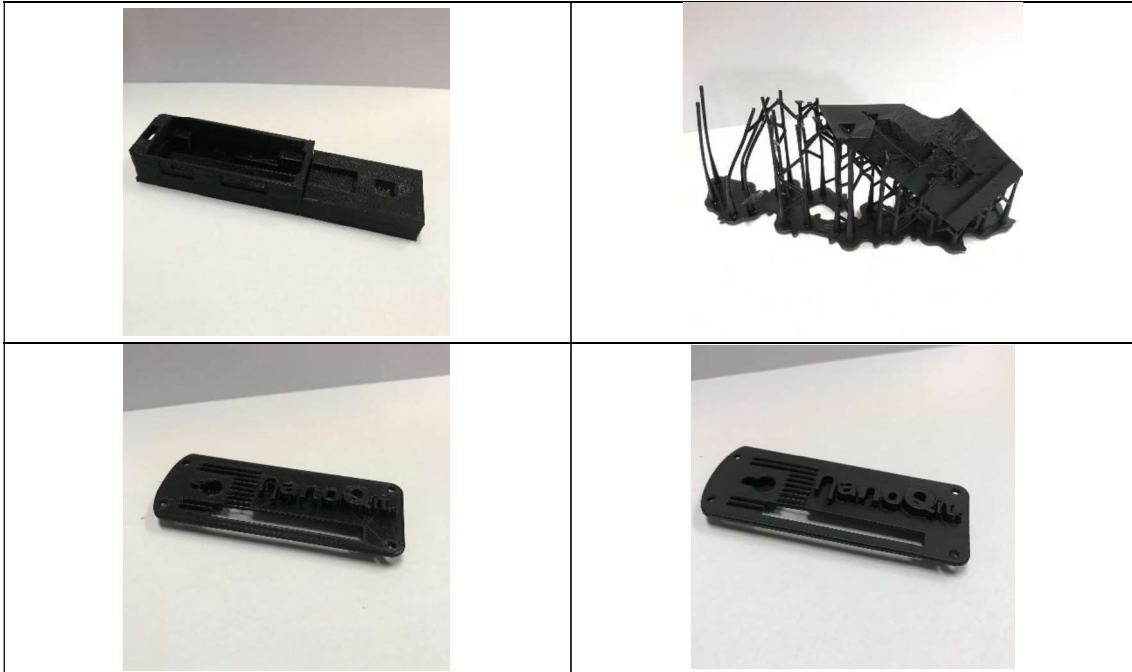
El manual de montaje y uso del sistema en línea, así como el manual de usuario de la aplicación ejecutable se encuentran en el [Anexo7](#).

5.3 PROTOTIPO DE IMPRESIÓN 3D

Se obtuvo los siguientes sistemas impresos:

Tabla 4. 1 Comparativa estructuras 3D en distintas impresoras.

Impresora 3D FDM Anet A8	Impresora 3D SLA FormLabs1+
 A black 3D printed part, likely a mechanical component, showing a cylindrical upper section with a hole, mounted on a square base. The surface has a visible layer-by-layer texture characteristic of FDM printing.	 Two images of the same black 3D printed part. The top image shows the part from a side angle, highlighting its smooth surface and sharp edges. The bottom image shows the part from a top-down perspective, revealing a more complex, textured base structure compared to the FDM version.



Sistema Impreso Final en Impresora FDM Anet A8



Se observa que la impresión 3D SLA no completa las piezas en la mayoría de las impresiones, esto tal vez se deba al tamaño. Aunque los detalles son mejores en la impresora SLA se optó por usar la impresora FDM por su costo y eficiencia en las impresiones.

5.4 OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LOS HOLOGRAMAS

Los hologramas e imágenes obtenidas con el sistema de holografía sin lentes en geometría de transmisión propuesto se presentan a continuación:

Se observa a la izquierda de la [Figura 4.1](#) el campo de visión del sensor “Camera Module for Raspberry Pi Zero, Adafruit 5MP.” El FOV es distinto al área completa del sensor, debido a las limitaciones de conectividad entre el programa MatLabR2018b y el Raspberry pi Zero W. El mayor formato posible es de 1280x720 pixeles, que es equivalente a 1,792 x 1,008mm. Se obtuvo el interferograma y se reconstruyó numéricamente mediante el ejecutable detallado en el [Anexo5](#). En los recuadros rojos se compara el campo de visión de un microscopio tradicional, en este caso el Motic BA310 con sus distintos aumentos. A la derecha se ha tomado un área de interés y se compara la amplitud original del interferograma, la amplitud y la fase reconstruidas de la sección seleccionada en el recuadro azul. Nótese que a pesar de la reducción del campo de visión y la toma de una sección, el área de estudio es mucho mayor que el campo de visión del microscopio.

Se notó en la [Figura 4.2](#) que en la escala mayor a los 500 μ m no se observa mayor difracción, a tal punto que el holograma capturado y la reconstrucción numérica son semejantes. A la derecha se encuentra una imagen tomada con el microscopio Motic BA310 con un aumento de 10X, Como se observa el número se encuentra definido, mostrando una precisión aceptable del sistema de holografía en línea en el orden de los ~500 μ m. Debido a la transformada de Fourier que se usa en el método de reconstrucción mediante el espectro angular, se observó unas franjas en los bordes de la imagen obtenida.

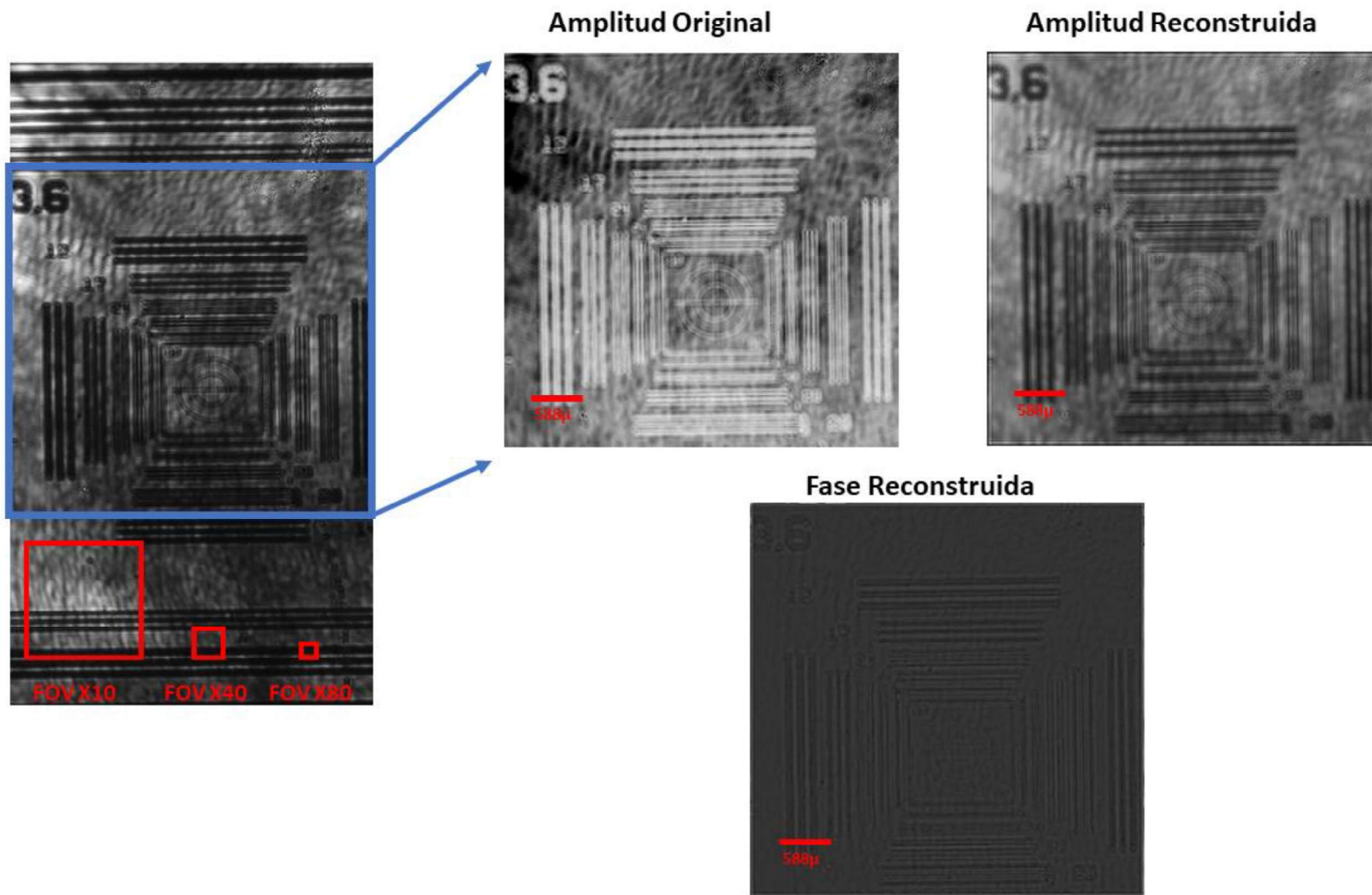


Figura 4. 1 Blanco de prueba “NBS 1952 Resolution Test Target 3” x 1””. Se observa a la izquierda el campo de visión completo, a la derecha la amplitud original, fase y amplitud reconstruidas

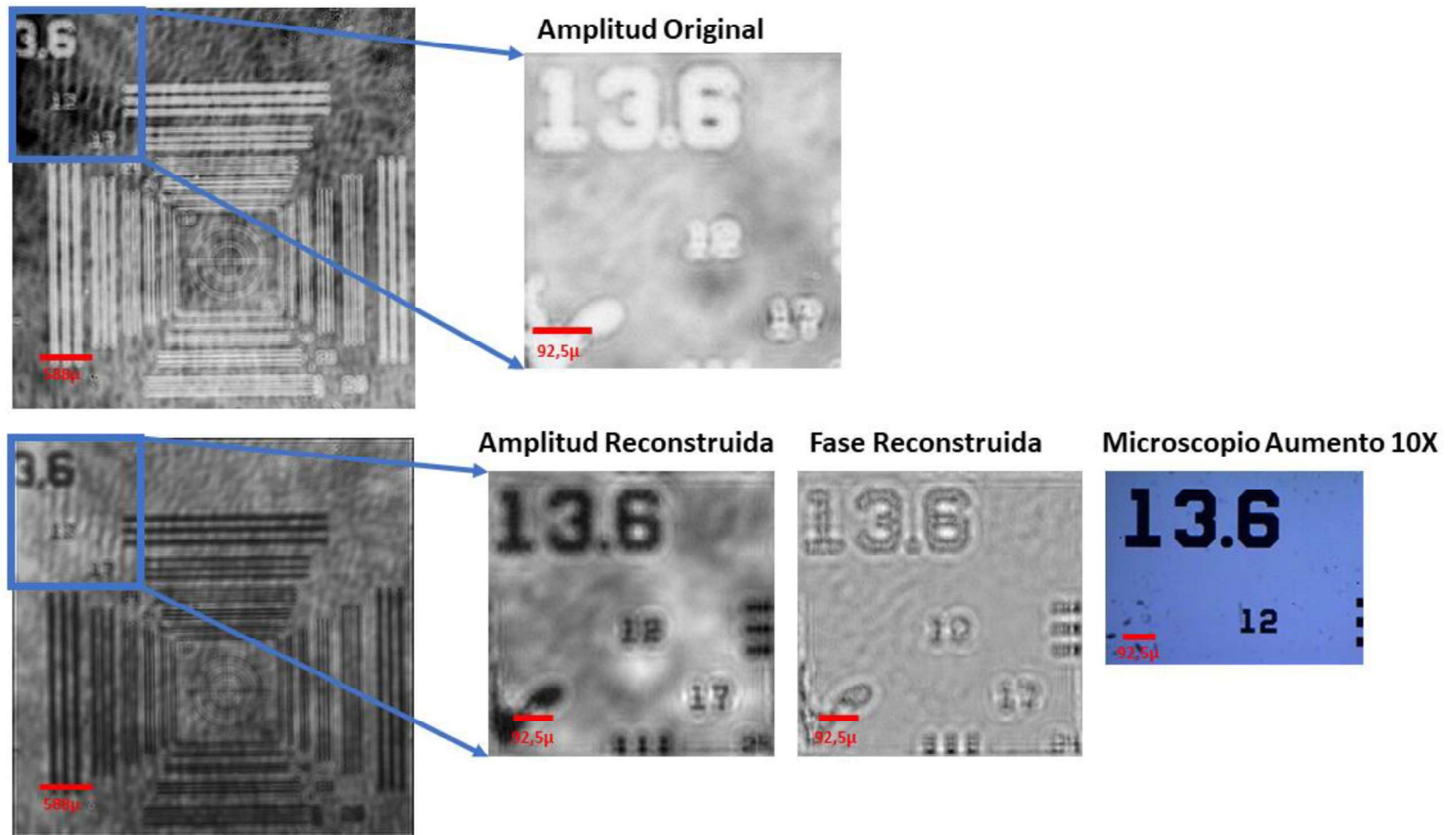


Figura 4. 2 Reconstrucción Blanco de Prueba. Sección ampliada, Amplitud original, amplitud reconstruidas e imagen tomada con el microscopio con un aumento de 10X.

En la [Figura 4.3](#), se tiene a la izquierda una comparación entre el holograma obtenido y su reconstrucción numérica. A la derecha de la figura se tiene la comparación de la sección delimitada por el recuadro azul, se aprecia la fase reconstruida con su amplitud reconstruida y la imagen tomada con el microscopio con un aumento 10X. Se observa que en el orden de los $\sim 200 \mu\text{m}$ la dispersión de las ondas y la interferencia es lo suficientemente notable para generar un mapa de interferencias sobre la muestra, no se logra distinguir a simple vista el número que se encuentra en el recuadro azul por lo que es necesario la reconstrucción numérica del sistema para deconvolucionar y procesar el interferograma y así obtener la información de la muestra. El microscopio sin lentes en geometría de transmisión funciona en el orden de los cientos de micrómetros.

En la [Tabla 4.1](#) se tomó secciones de la amplitud reconstruida previamente en la [Figura 4.3](#) y se comparó con imágenes tomadas con el microscopio en aumentos de 40X y 100X, siendo este último el máximo aumento que ofrece. Se observa que el sistema presenta problemas para la reconstrucción, esto se debe al tamaño de la muestra, según la teoría la resolución máxima se encuentra dada por el tamaño del pixel, sin embargo, se observó que en el orden de los $\sim 10 \mu\text{m}$ el programa reconstruye la amplitud con los bordes de los números difusos. Esto se debe principalmente al ruido de fondo, al índice S/R a la calidad del sensor o al método mismo de reconstrucción numérica. Se observó también que el sistema funciona para los $\sim 90 \mu\text{m}$, perfilando bastante bien los números.

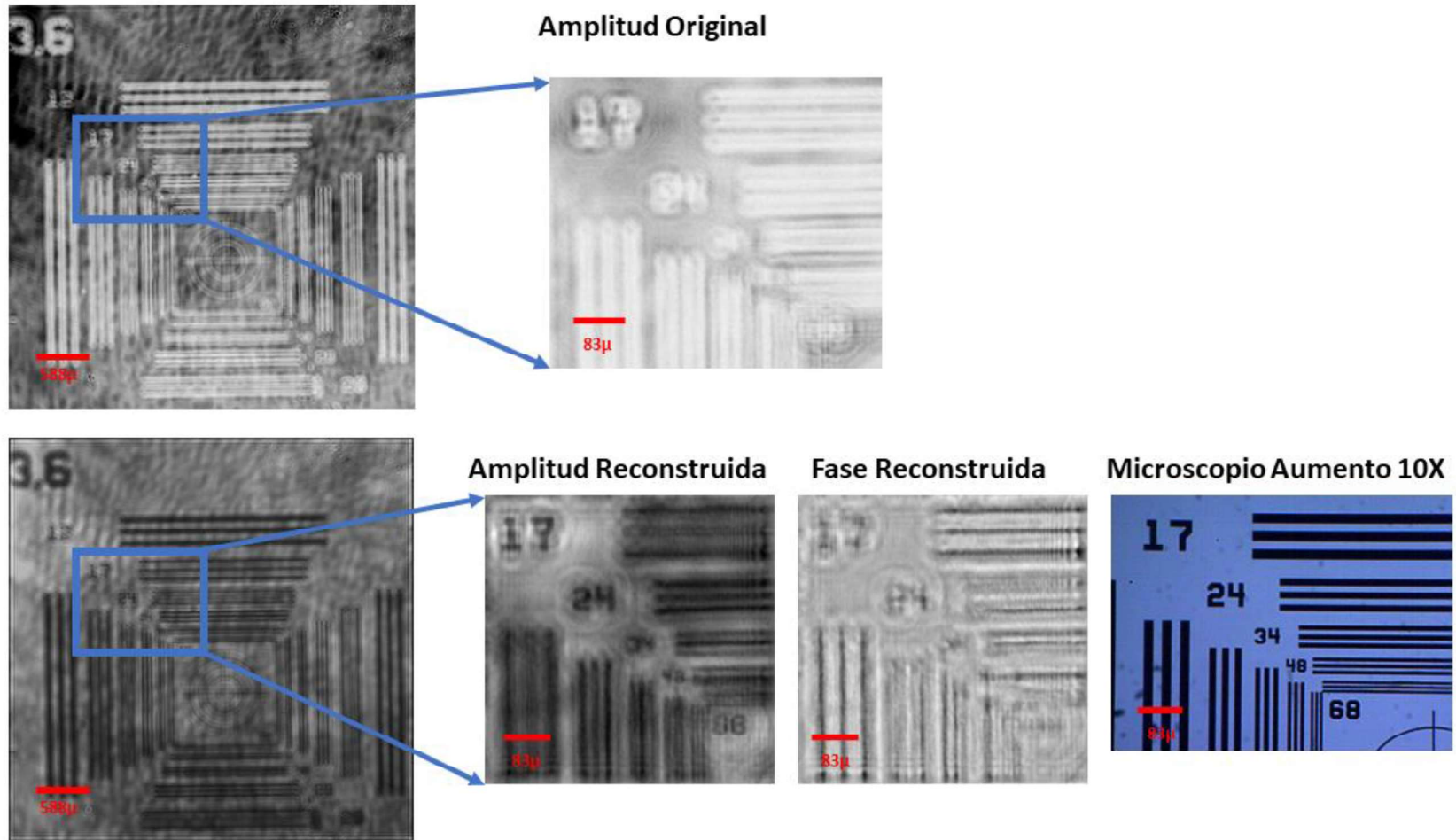
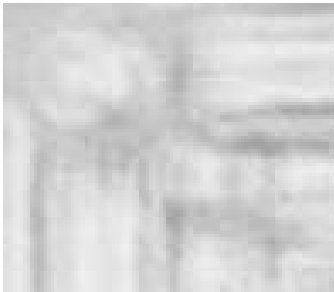

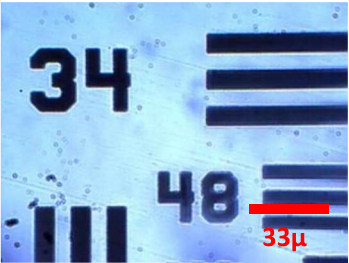
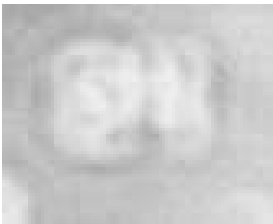


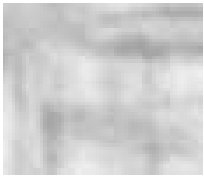




Figura 4. 3 Reconstrucción Blanco de Prueba. Sección ampliada, Amplitud original, amplitud reconstruidas e imagen tomada con el microscopio con un aumento de 10X

Tabla 4. 2 Reconstrucción Blanco de Prueba. Amplitud original, amplitud reconstruidas e imagen tomada con el microscopio con un aumento de 40X y 100X.

Amplitud Original	Amplitud Reconstruida	Aumento microscopio 40X
		
Aumento microscopio 100X		
		
		

Se observa en la [Figura 4.4](#) el holograma registrado de la muestra de tuberculosis y la reconstrucción de la fase y amplitud de la sección delimitada por el recuadro azul. El campo de visión del sensor "Camera Module for Raspberry Pi Zero, Adafruit 5MP" es el holograma total y su comparación con el campo de visión en relación al microscopio "Motic BA310" con sus aumentos x10 y x40 en los recuadros rojos.

En la [Figura 4.5](#) se tomó dos áreas de interés para ser analizadas, a la izquierda se ve la amplitud reconstruida en la [Figura 4.4](#), a la derecha una comparación de la amplitud reconstruida con el ejecutable con una imagen tomada con el microscopio "Motic BA310 con un aumento de x10. La muestra de tuberculosis es un buen ejemplo del tipo de objetos con el cual el sistema en línea reacciona de mejor manera. Se observó que la amplitud reconstruida perfila los bordes de la muestra y permite observar ciertas transparencias dentro de muestras densas, detalles como zonas más densas u oscuras no se observan diferenciadas en la amplitud reconstruida. En el orden $\sim 100 \mu\text{m}$ el sistema reconstruye con detalle las muestras con distintas densidades y perfil irregular.

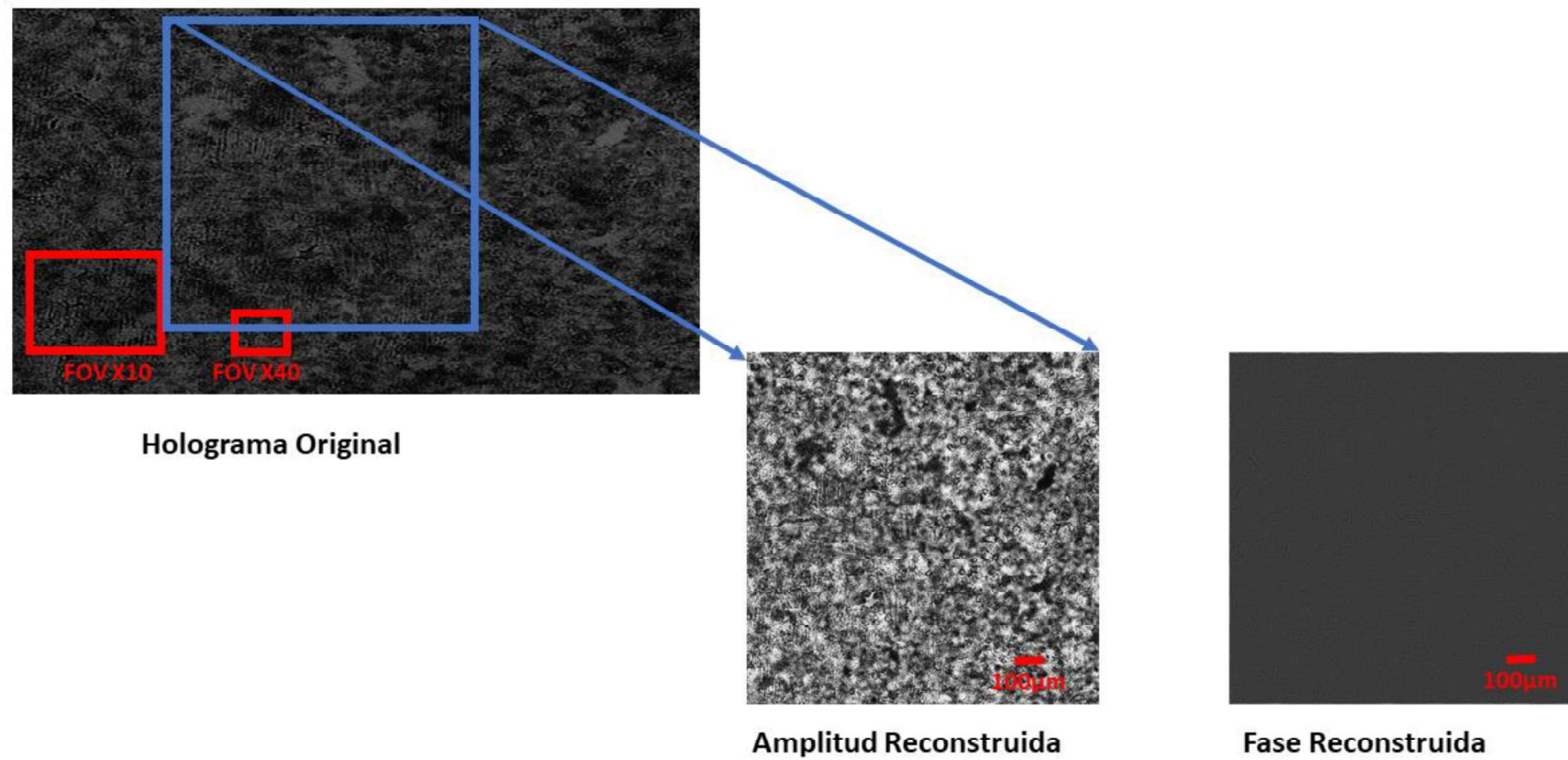


Figura 4. 4 Muestra de Tuberculosis. Se observa a la izquierda el holograma original de una muestra de tuberculosis, a la derecha se observa la fase y amplitud reconstruidas.

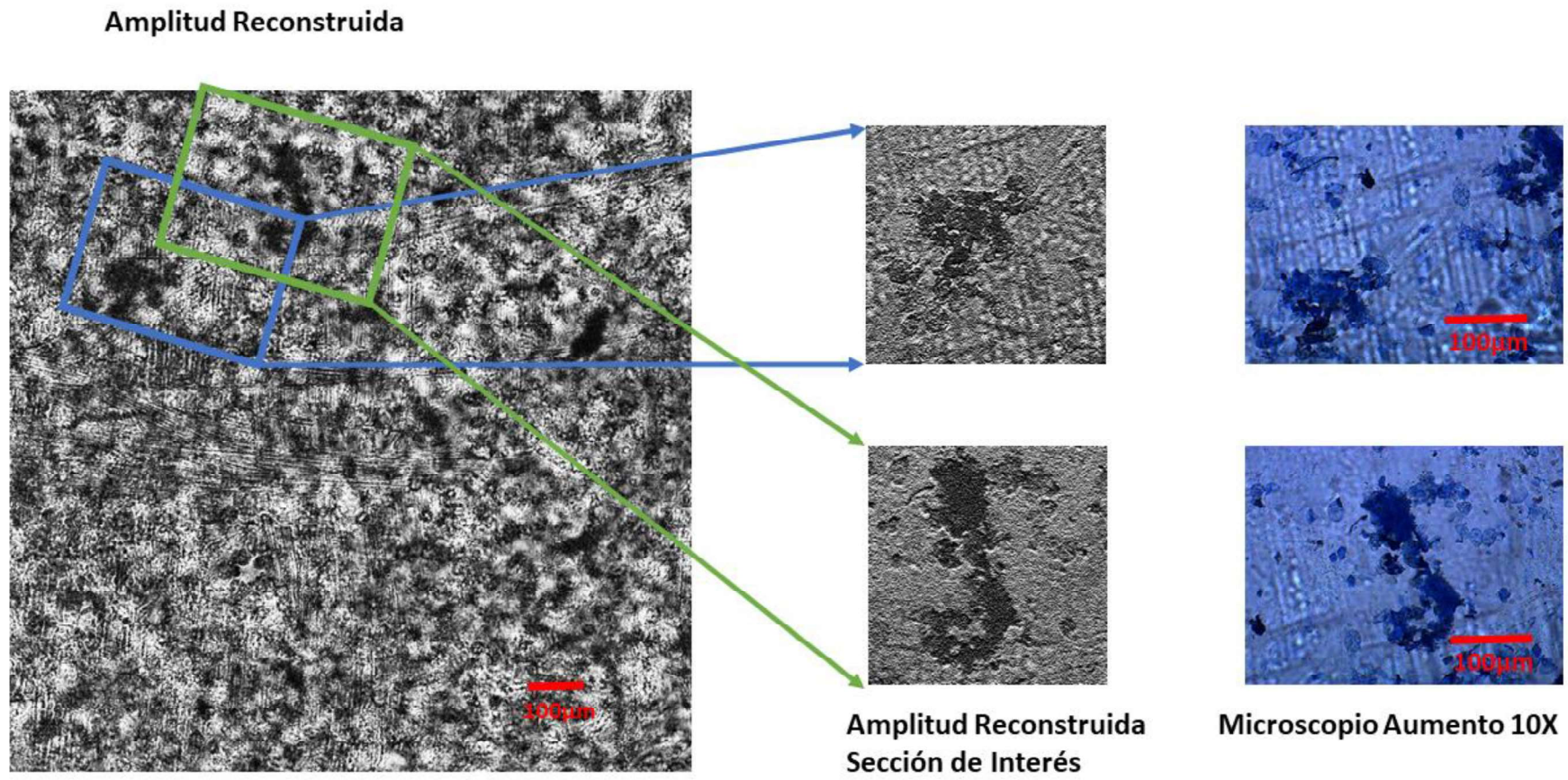


Figura 4. 5 Reconstrucción muestra de Tuberculosis. Sección ampliada, amplitud reconstruidas e imagen tomada con el microscopio con un aumento de 10X.

En la [Figura 4.6](#) se observa el holograma obtenido de una muestra de tallos de calabaza, se ha tomado dos secciones para comparar con imágenes tomadas con el microscopio Motic BA310. Como se mostró en la [Figura 4.2](#) a un orden mayor a los $500\mu\text{m}$ la dispersión no es suficiente para apreciar una diferencia con la reconstrucción numérica. Se observa los bordes de la muestra de tejido vegetal con gran detalle debido al tamaño y transparencia que poseen ya que permite el paso de luz, cumpliendo las condiciones para el método *Shadow Imaging* [1]. El método Shadow Imaging se realiza con la misma configuración del sistema [Figura 2.2](#), y no necesita reconstrucción numérica. Una muestra transparente se ilumina con una fuente de luz espacialmente limitada desde una distancia de z_2 , y la sombra de la muestra se registra directamente en el sensor de imagen a una distancia de z_1 .

En la [Figura 4.7](#) se observa el holograma obtenido de una muestra de alas de Polilla, Se realiza una comparación con el holograma directo y el aumento 40X del microscopio Motic BA310. Una vez más se nota que en muestras mayores a $500\mu\text{m}$, como son las venas de las alas, no es necesario la reconstrucción numérica. Los bordes y uniones son lo suficientemente grandes para tener una sombra imagen de la muestra. Los Ocelos, que son los pequeños puntos entre las venas, tienen una dimensión en el orden de los $10\mu\text{m}$ por lo que es necesario usar la reconstrucción del holograma para observar la imagen. Se compara la amplitud reconstruida con una imagen con un aumento 10x del microscopio. En este caso no se observa una reconstrucción clara de los Ocelos, esto puede deberse a la densidad de la muestra, evitando el paso y dispersión de toda la luz. Además, debido al alto número de centros dispersivos de la muestra la reconstrucción se complica ya que existe demasiada interacción entre ondas dispersadas.

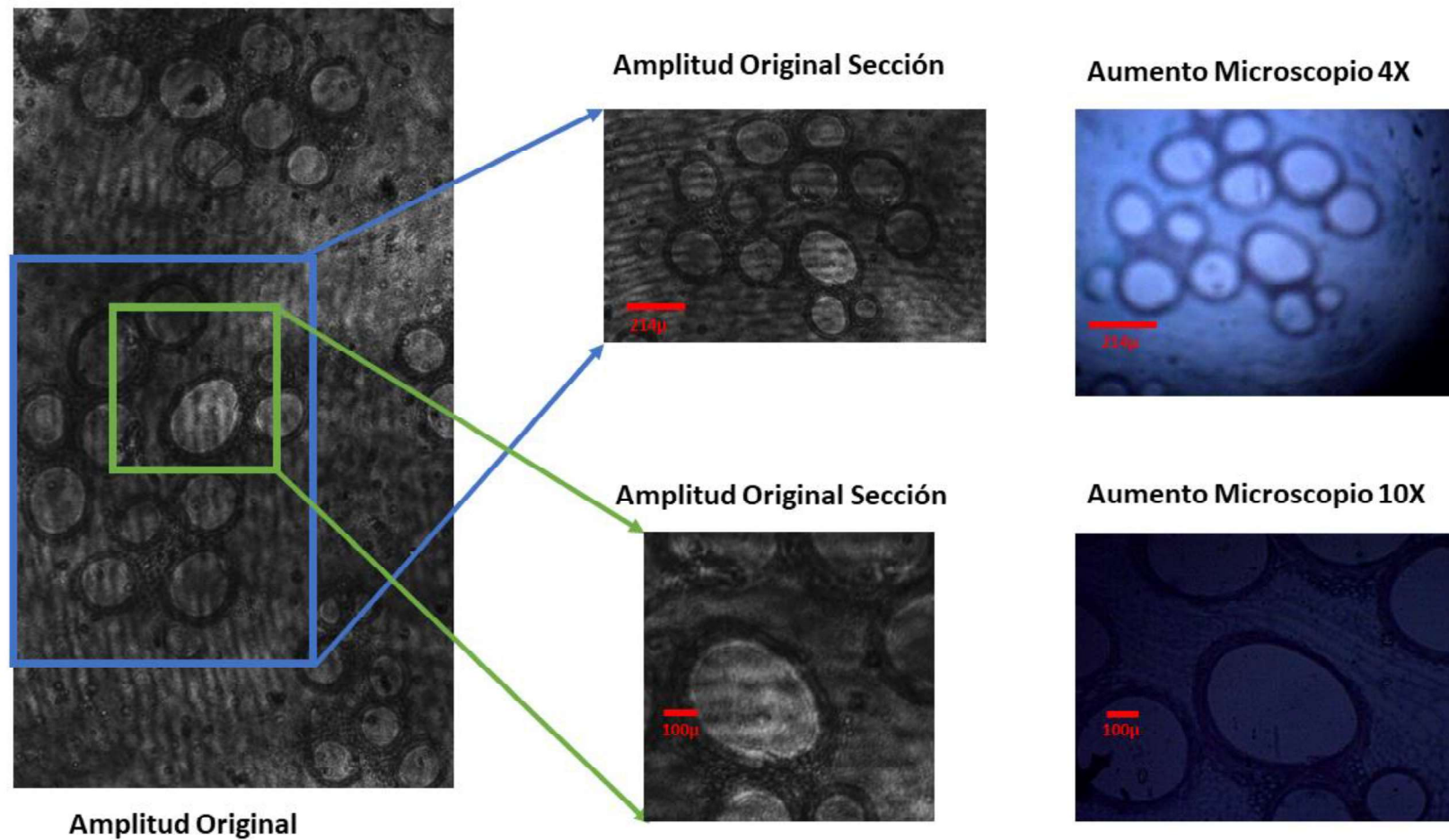


Figura 4. 6 Muestra de Tallos de Calabaza.. A la izquierda se observa el campo de visión completo de la muestra sin procesar, a la derecha se observa la comparación con imágenes del microscopio en aumento 4X y 10X.

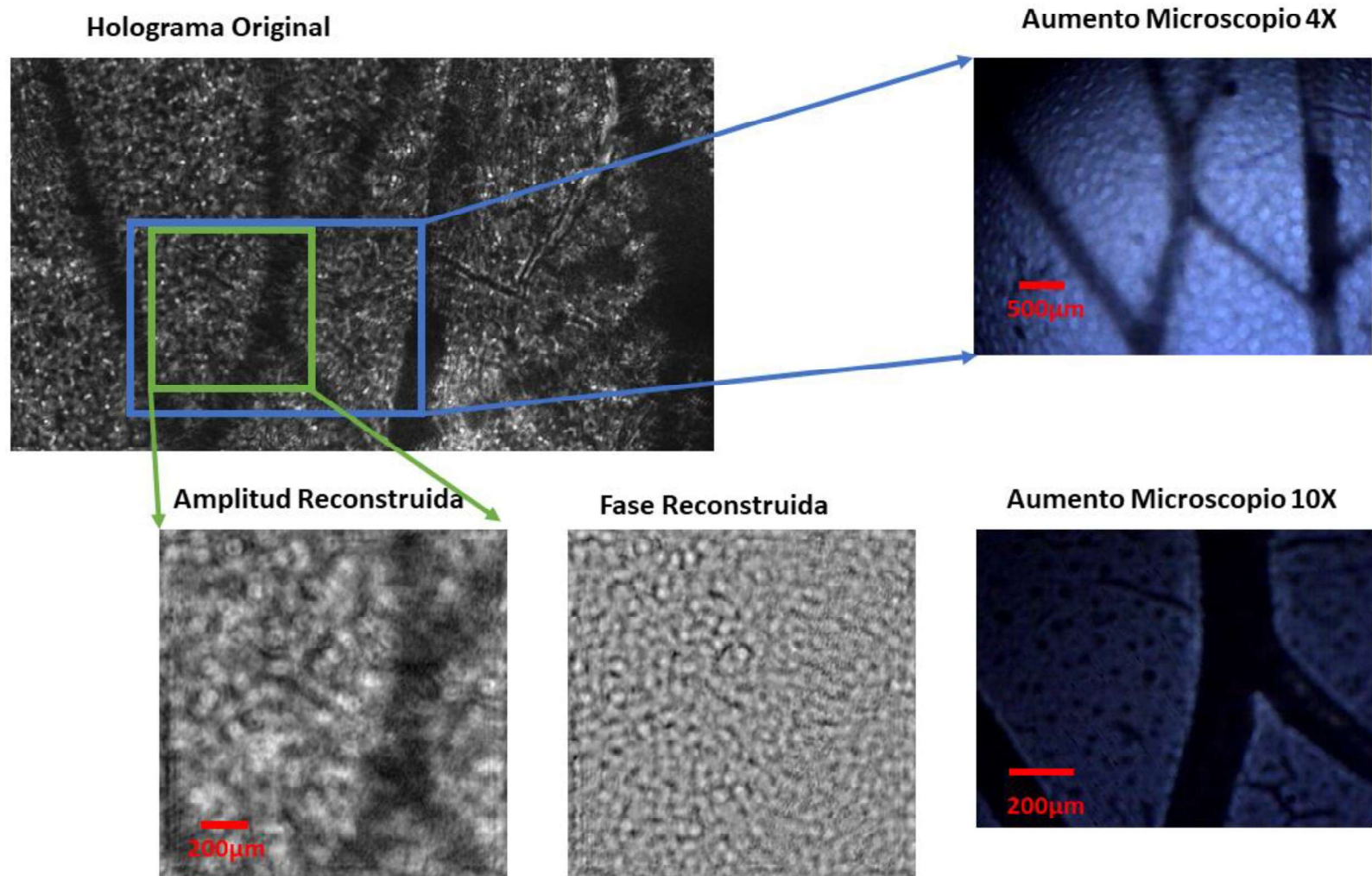


Figura 4. 7 Muestra de Alas de Polillas. Se observa la comparación de una sección de la amplitud reconstruida observa la comparación con imágenes del microscopio en aumento 4X y 10X.

En la [Figura 4.8](#) se observa el holograma de una muestra de micropartículas de poliestireno de $2.6\mu\text{m}$ suspendidas en agua, se ha ampliado una sección de interés y se ha comparado con una imagen del microscopio Motic, BA310 con un aumento de 10X.

En la [Figura 4.9](#) se observa la amplitud reconstruida con distintos valores de z_1 . La muestra es una suspensión de micropartículas por lo que las esferas de poliestireno se encuentran a distintas profundidades, entonces se varió la distancia del sensor a la muestra para tener planos paralelos al sensor. La reconstrucción perfila las micropartículas de $2.6\ \mu\text{m}$ dependiendo del plano que se encuentren en la suspensión, a pesar de parecer juntas en la imagen del microscopio, el interferograma reconstruido revela que se encuentran a distinta profundidad en la suspensión.

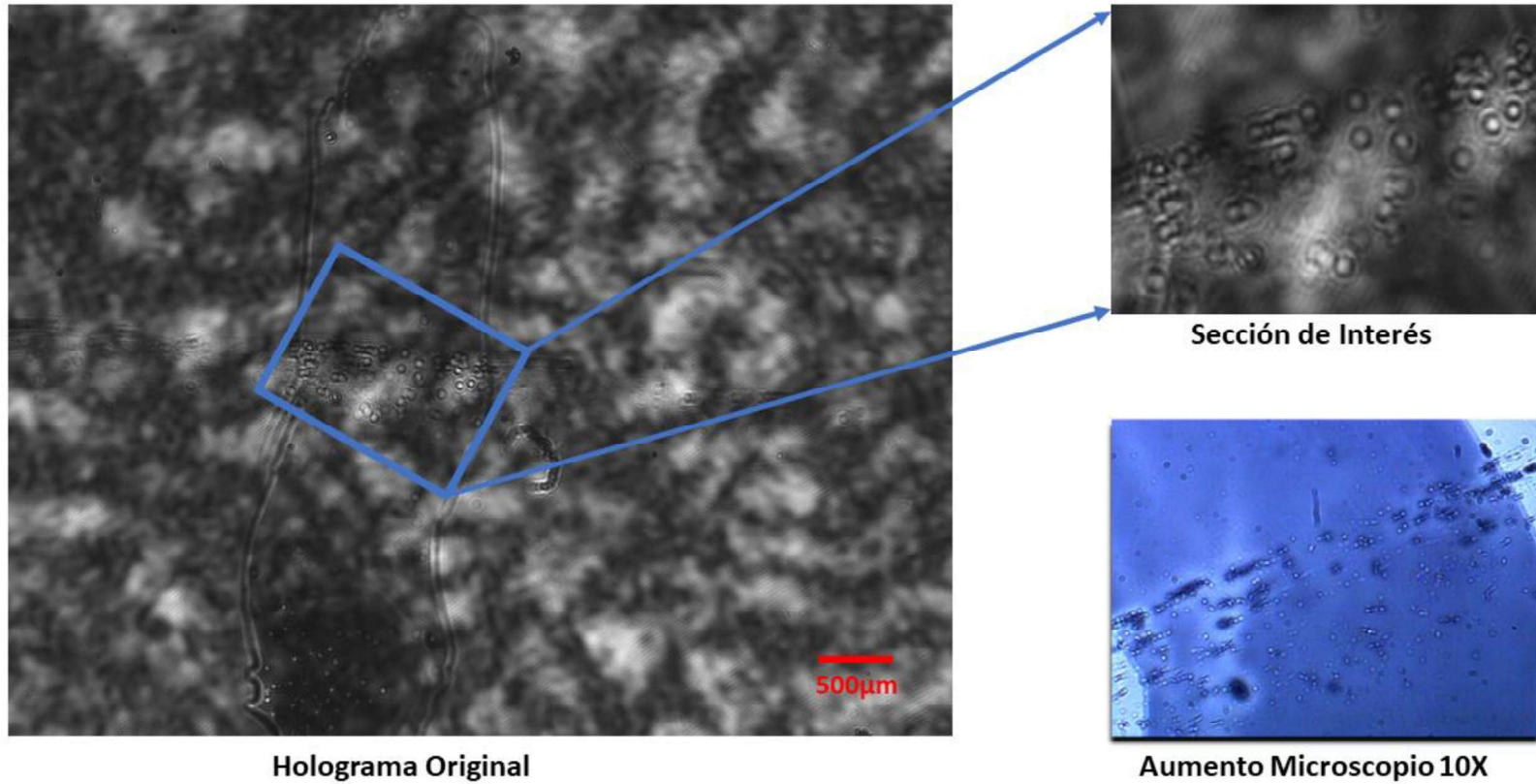
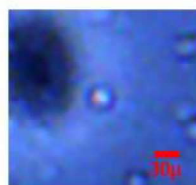
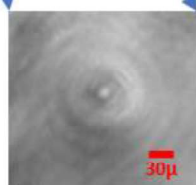
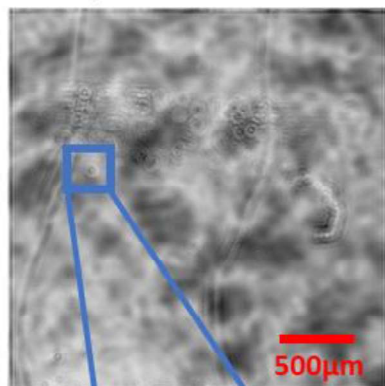
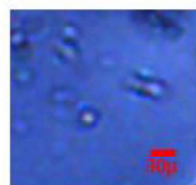
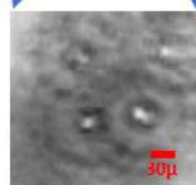
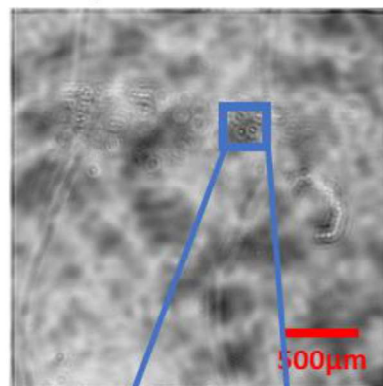


Figura 4. 8 Muestra de Micropartículas. Se observa a izquierda el holograma de una muestra de micropartículas de $2.6\mu m$ tomado con el FOV completo del sensor y su comparación con el FOV del microscopio con el aumento 10X. A la derecha, una ampliación de la sección de interés y una imagen tomada con el microscopio.

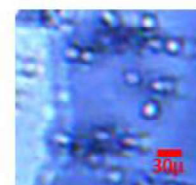
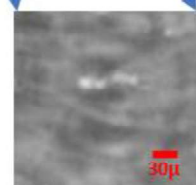
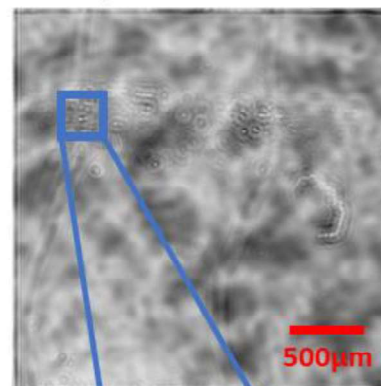
a) Amplitud reconstruida
 $z_1 = 0,00143m$



b) Amplitud reconstruida
 $z_1 = 0,00143m$



c) Amplitud reconstruida
 $z_1 = 0,00193m$



d) Amplitud reconstruida
 $z_1 = 0,00203m$

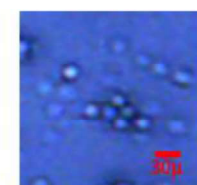
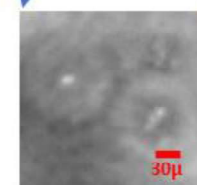
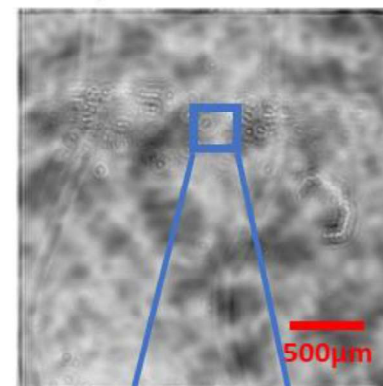


Figura 4. 9 Reconstrucción de Micropartículas Se observa de arriba hacia abajo: la amplitud reconstruida a distintas distancias z_1 , ampliación de la reconstrucción del área de interés de la muestra de micropartículas, imagen tomada con el microscopio con un aumento 10X del área de interés

6 CONCLUSIONES

Se construyó un sistema de microscopía holográfica digital de transmisión en línea sin lentes, de campo de visión de 1.792 x 1.008 mm, con una resolución de $\sim 3\mu\text{m}$, con un sensor CMOS para la tarjeta electrónica Raspberry pi Zero W, montada un sobre un sistema impreso en 3D.

Se determinaron los parámetros óptimos de operación para la obtención de un mapa de interferencias en línea. Esto permitió la deconvolución y posterior reconstrucción numérica de la amplitud y fase de la muestra.

Se desarrollo una aplicación ejecutable en MatLAB R2018b que permite obtener una imagen microscópica de una muestra, calibrado para la longitud de onda de 532nm y una distancia del sensor a la muestra $z_1 = 0.00069\text{m}$, permitiendo escoger la sección que se desea analizar en la muestra, para evitar la carga de procesamiento en zonas de poco o nulo interés de la muestra.

Se incorporó el sistema sin lentes de transmisión en línea a un estuche impreso en 3D: robusto, portable y ligero que permite el registro de muestras in situ en lugares de difícil acceso, con potenciales uso en detección de enfermedades que necesitan de imágenes microscópicas para su diagnóstico, como es la malaria.

Se demostró el uso del microscopio sin lentes en muestra biológicas y en micropartículas. Las imágenes mostraron los perfiles y definieron las formas lo que indica potenciales usos en detección de tejido cancerígeno, conteo de población de bacterias, entre otros.

Se obtuvo un campo de visión (FOV) de 1.798x1.098mm lo que representa un tamaño aproximado de 10 veces mayor a un microscopio tradicional con un aumento de 10X. Este amplio campo de visión presenta ventaja en el análisis de micro recorridos, a diferencia de un microscopio o cualquier otro sistema óptico de microscopía que necesita seguir a la muestra, el sistema en línea presentado puede ver el recorrido de la muestra en tiempo real y reconstruir la imagen en el fotograma que sea de interés.

Se ha logrado crear un sistema de costo competitivo que presenta ventajas con relación al microscopio tradicional. El sistema opera en el rango de los $3\mu\text{m}$ a los $\sim 400\mu\text{m}$ mediante reconstrucción holográfica, para muestras relativamente

grandes de más de 500 μm no es necesaria una deconvolución del holograma ya que no presenta mayor difracción.

Se observó que para muestras mayores a 500 μm el sistema de holografía sin lentes funciona por el método *Shadow Imaging*, ya que el mapa de interferencias es casi imperceptible y no es necesario realizar una deconvolución de la imagen para observar la muestra, esto se puede usar a favor usando una fuente de luz no coherente y sin longitud de onda fija, como un LED blanco, evitando así la calibración fuente-muestra-sensor en el mismo eje.

En muestras suspendidas es posible variar la distancia z_1 del programa de reconstrucción para obtener imágenes de distintos planos paralelos al sensor.

El sistema sin lentes de microscopía holográfica realizado en este proyecto es único en la región andina. En relación con trabajos similares como los desarrollados por el grupo Ozcan [1,3,6,27] se obtiene en nuestro caso una resolución menor. Esto se debe al tamaño del píxel del sensor utilizado que en nuestro caso ~ 3 mm. Sin embargo, se logró alcanzar a resolución máxima teórica que pueden ofrecer los componentes de bajo costo adquiridos para nuestro sistema (3 μm). Otros autores muestran resultados similares con sus propios componentes [6,27].

Otro parámetro importante en estos sistemas de microscopía es el campo de visión (Field of view, FOV). Los microscopios convencionales, como ya se dijo, alcanzan hasta unos pocos mm^2 en este aspecto, como se mencionó. En nuestro caso, y otros similares en la literatura [1,2], el campo de visión (FOV) casi coincide con toda el área activa del sensor óptico (En nuestro caso, 1.792 x 1.008 mm^2). Esto es de orden de 50000 o 60000 más área en nuestro caso.

Un problema complicado es el del desarrollo del sistema de adquisición y análisis de datos. En todos los casos reportados en la literatura, incluyendo el nuestro, se tiene que desarrollar el software correspondiente, desde el manejo y adquisición de datos (imágenes “crudas”), hasta su modelación y procesamiento. Nuestro sistema se limita al análisis a través del método de espectro angular. Otros incluyen otros modelos y facilidades de análisis adicionales [7,11,16,20,21]. Entre las novedades en el desarrollo de nuestro sistema, se

optimizó el proceso de adquisición de datos mediante una conexión con una tarjeta electrónica de fácil acceso, Raspberry pi Zero W. Una configuración con esta tarjeta electrónica específica no se ha realizado anteriormente, según la investigación bibliográfica, al momento de presentar este manuscrito. En términos del costo del sistema, y de acuerdo con las decisiones tomadas, nuestro sistema tiene el menor costo en comparación con todos los revisados en la bibliografía. El uso de componentes de bajo costo y el diseño de la estructura basado en impresión 3D, permitió que el costo total borde los \$150,00 USD. Sistemas similares son mucho más costosos, debido a que solamente el sensor tiene un precio aproximado mayor que \$350,00USD. En definitiva, nuestro sistema es una solución muy competitiva y con gran relación calidad-precio, cuando se compara con todos los sistemas investigados.

RECOMENDACIONES

Como trabajo a futuro, se puede mejorar la resolución del sistema usando la técnica de sub-pixel, que elimina el limitante del tamaño del pixel para la resolución. Además, se puede trabajar con varias fuentes de luz de distinta longitud de onda, apuntando en distintos ángulos para realizar un análisis multiespectral y obtener información del volumen de la muestra.

Usando un método de reenfoque digital es posible eliminar las interferencias que aparecen debido al distinto z_1 que se produce en muestras con una profundidad considerable, además se puede intentar eliminar el ruido de los bordes cambiando las condiciones de frontera o realizando una función de apodización. Se puede usar la información de la muestra que guarda la fase, que no ha sido estudiada a fondo en este proyecto.

7 REFERENCIAS

- [1] A. Ozcan and E. McLeod, "Lensless Imaging and Sensing," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 18, no. 1, pp. 77–102, 2016.
- [2] S. Seo *et al.*, "Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications," *Lab Chip*, vol. 10, no. 11, p. 1417, 2010.
- [3] O. Mudanyali, A. Erlinger, S. Seo, T. Su, D. Tseng, and A. Ozcan, "Lensless On-chip Imaging of Cells Provides a New Tool for High-throughput Cell-Biology and Medical Diagnostics," no. December, pp. 3–5, 2009.
- [4] D. Dirksen *et al.*, "Lensless Fourier holography for digital holographic interferometry on biological samples," *Opt. Lasers Eng.*, vol. 36, no. 3, pp. 241–249, 2001.
- [5] J. M. A. Rodenburg, A. C. Hurst, and A. G. Cullis, "Transmission microscopy without lenses for objects of unlimited size," vol. 107, pp. 227–231, 2007.
- [6] Y. Wu and A. Ozcan, "Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring," *Methods*, 2017.
- [7] J. W. Goodman, "Introduction to Fourier Optics McGraw-Hill Series in Electrical and Computer Engineering," *Optical Soc. Part B*, vol. 8, no. 5, p. 491, 1996.
- [8] G. J. Lora, N. Munera, and J. I. García-Sucerquia, "Modelling and reconstruction of gabor-type holograms," *Dyna*, vol. 166, no. April 2011, pp. 81–88, 2011.
- [9] G. Coast, N. Zealand, and S. Africa, "Nature 777," no. 4098, pp. 777–778, 1948.
- [10] M. A. Shampo, R. A. Kyle, and D. P. Steensma, "Aleksandr Prokhorov—Lasers and Masers," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 86, no. 5, p. e33, 2011.
- [11] J. Zhao, H. Jiang, and J. Di, "Recording and reconstruction of a color holographic image by using digital lensless Fourier transform holography," *Opt. Express*, vol. 16, no. 4, p. 2514, 2008.
- [12] K. M. Molony, B. M. Hennelly, D. P. Kelly, and T. J. Naughton, "Reconstruction algorithms applied to in-line Gabor digital holographic microscopy," *Opt. Commun.*, vol. 283, no. 6, pp. 903–909, 2010.
- [13] U. Schnars, C. Falldorf, J. Watson, and W. Jüptner, "Digital holography and wavefront sensing: Principles, techniques and applications," *Digit. Hologr. Wavefront Sens. Princ. Tech. Appl.*, pp. 1–226, 2015.
- [14] S. Svanberg, "Optical analysis of trapped Gas—Gas in Scattering Media Absorption Spectroscopy," *Laser Phys.*, vol. 20, no. 1, pp. 68–77, 2010.
- [15] S. Svanberg, "Gas in scattering media absorption spectroscopy - from basic studies to biomedical applications," *Laser Photonics Rev.*, vol. 7, no. 5, pp. 779–796, 2013.
- [16] M. K. Kim, "Principles and techniques of digital holographic microscopy," *J. Photonics Energy*, no. May 2010, p. 018005, 2010.
- [17] R. A. Fisher, "Optical Phase Conjugation," Elsevier., New York, 1983.
- [18] P. Hariharan, *Optical Holography: Principles, Techniques, and Applications*, Addison-W. New York, 1996.

- [19] T.-C. Poon and J.-P. Liu, *Introduction to Modern Digital Holography with MATLAB*, 1ed ed. New York: Cambridge University Press, 2014.
- [20] T. Lатычевскаиа and H.-W. Fink, "Practical algorithms for simulation and reconstruction of digital in-line holograms," 2014.
- [21] T. Lатычевскаиа and H. Fink, "Solution to the Twin Image Problem in Holography," vol. 233901, no. June, pp. 1–4, 2007.
- [22] T. Lатычевскаиа and H. Fink, "Simultaneous reconstruction of phase and amplitude contrast from a single holographic record," vol. 17, no. 13, pp. 10697–10705, 2009.
- [23] "La transformada de Fourier . Aplicación al filtrado de imágenes."
- [24] P. D. Ramón, O. Guardado, and D. V. González, "Transformada de Fourier en aplicación en el diseño de filtros digitales para el procesamiento de imágenes .," pp. 1–10, 2010.
- [25] V. Friedrich, "Transformada de Fourier de una Imagen y filtrado de una imagen en el dominio de la frecuencia . Funciones de Variable Compleja," 2013.
- [26] B. Y. J. A. Ratcliffe, "SOME ASPECTS OF DIFFRACTION THEORY AND THEIR APPLICATION TO THE IONOSPHERE," vol. 188, 1956.
- [27] M. Lee, O. Yaglidere, and A. Ozcan, "Field-portable reflection and transmission microscopy based on lensless holography," *Biomed. Opt. Express*, vol. 2, no. 9, p. 2721, 2011.
- [28] "Modified NBS 1952 Target," p. 76, 2014.
- [29] A. Upright, "Ba 310."

8 ANEXOS

ANEXO 1

Código de conexión y control de la cámara Raspberry mediante MatLAB 2018b.

```
% --- conectar al raspberry y obtención de imágenes
seguidas en resolución 320x240

mypi=raspi('192.168.2.18','pi','raspberry')
wcam = webcam(mypi)
while get(hObject,'Value')
    img = snapshot(wcam)

    axes(handles.muestra_imagen)
    axis off
    imagesc(img)
    pause(0.2)
end
set(handles.foto,'Value',0)
clear all;

% --- conectar al raspberry y captura de imagen en
resolución 1280x720

mypi=raspi('192.168.2.18','pi','raspberry')

wcam = webcam(mypi,'mmal service 16.1 (platform:bcm2835-
v412):','1280x720')
pause(5)
img = snapshot(wcam)
muestra = img;
imwrite(muestra,'interferograma.tif');
clear all
```

ANEXO 2

Código de simulación de holograma mediante ondas planas

```
%Parámetros

lambda = 532*10^(-9);           % longitud de onda en metros
```

```

z = 0.001;           % Distancia objeto-detector en
metros z1
p = 0.01;           % tiempo de pausa ,mostrar la imagen

%recortar imagen

I = imread('prueba.jpg'); %lee imagen
[J1, rect] = imcrop(I);
close('all');
dimensiones = size(J1);
if dimensiones(1) ~= dimensiones (2)
    if rect(3) > rect(4)
        rect2 = [rect(1) rect(2) rect(3) rect(3)];
    end
    if rect(4) > rect(3)
        rect2 = [rect(1) rect(2) rect(4) rect(4)];
    end
    J2 = imcrop(I,rect2);
end
if dimensiones(1) == dimensiones (2)
    J2 = J1;
end

%Leer la imagen recortada

dimensiones = size(J2);
P= dimensiones(1);
muestra_area = dimensiones (1)*1.67*10^(-6);

%Creando funcion de transmision del plano obejto

muestra = zeros(P,P);
    muestra0 = J2; %lee la imagen del archivo especificado por
el nombre
    muestra(:, :) = muestra0(:, :, 1); %lee el canal 1 de un
archivo RGB, en este caso el canal rojo R
    muestra = (muestra - min(min(muestra)))/(max(max(muestra)) -
min(min(muestra))); %reescala la imagen en gris
    figure, imshow(muestra, []); %crea una ventana

amp = exp(-1.6*muestra); % exp(-1.6)=0.2 valor estandar
fa = - 3*muestra; % 3 = x+y+z vectores

t = zeros(P,P);
t = amp.*exp(i*fa); %funcion de transmision

% Simulando holograma mediante el término propagador

```

```

prop = Propagador(P, lambda, muestra_area, z);
U = IFT2D(FT2D(t).*conj(prop));
holograma = abs(U).^2;

figure('Name','Holograma Simulado','NumberTitle','off')
imshow(holograma, []), colorbar;
colormap(gray)

%guardando el holograma

fid = fopen(strcat('prueba.bin'), 'w');
fwrite(fid, holograma, 'real*4');
fclose(fid);

p = holograma;
p = 255*(p - min(min(p)))/(max(max(p)) - min(min(p))); %
reescalamos para poder observar la imagen
imwrite (p, gray, 'prueba.bmp');

```

Función propagadora

```

%PROPAGACIÓN DE ONDAS POR MÉTODO DE ESPECTRO ANGULAR

function [p] = Propagador(P, lambda, lado, z) %parámetros se
ingresan en programa de reconstrucción

p = zeros(P,P);

for ii = 1:P;
    for jj = 1:P
        alpha = lambda*(ii - P/2 -1)/lado;
        beta = lambda*(jj - P/2 -1)/lado;
        if ((alpha^2 + beta^2) <= 1)
            p(ii,jj) = exp(-2*pi*i*z*sqrt(1 - alpha^2 -
beta^2)/lambda);
        end;
    end
end;
end;

```

Transformada de Fourier 2d

```

% Transformada de Fourier 2d

function [out] = FT2D(in)

```

```

[Nx Ny] = size(in);
f1 = zeros(Nx,Ny);
for ii = 1:Nx
    for jj = 1:Ny
        f1(ii,jj) = exp(i*pi*(ii + jj));
    end
end

FT = fft2(f1.*in); %transformada de fourier en 2d dimensiones
multi arreglo dado por in matriz 500*500

out = f1.*FT;

```

Transformada inversa de Fourier 2d

```

% Transformada inversa de Fourier 2d

function [out] = IFT2(in)

[Nx Ny] = size(in);
f1 = zeros(Nx,Ny);
for ii = 1:Nx
    for jj = 1:Ny
        f1(ii, jj) = exp(-i*pi*(ii + jj));
    end
end

FT = ifft2(f1.*in); % similar a fft2d

out = f1.*FT;

```

ANEXO 3

Programa de Reconstrucción numérica basado en el método del espectro angular de ondas planas

```

close all
clear all

%PARAMETROS

Iteraciones = 100; % numero de iteraciones
longitud_de_onda = 532*10^(-9); % longitud de onda en metros

```

```

z1 = 0.0015;           % Distancia objeto-detector
en metros
p = 0.01;             % tiempo de pausa ,mostrar la
imagen

%Seleccionar parte de interes del holograma

I = imread('6.bmp');   %lee la imagen especificada
[J1, rect] = imcrop(I); %recorta la imagen
close('all');
dimensiones = size(J1);
if dimensiones(1) ~= dimensiones (2)
    if rect(3) > rect(4)
        rect2 = [rect(1) rect(2) rect(3) rect(3)];
    end
    % reescala la
imagen
    if rect(4) > rect(3)
        rect2 = [rect(1) rect(2) rect(4) rect(4)];
    end
    J2 = imcrop(I,rect2);
end
if dimensiones(1) == dimensiones (2)
    J2 = J1;
end

%Leer el holograma

dimensiones = size(J2); %toma las dimensiones de
la imagen reescalada
P= dimensiones(1);     % numero de pixeles en
base al area seleccionada
lado_area = dimensiones (1)*1.4*10^(-6); % multiplica
el pixel por el tamano en metros
muestreal = zeros(P,P); %crea una matriz de ceros
de dimension PxP
muestra = J2;         %lee el interferograma
seleccionado de la muestra completa
muestreal(:, :) = muestra(:, :, 1); %toma solo el canal rojo
de la matriz y transforma en double
hologramal = ((muestreal -
min(min(muestreal)))/(max(max(muestreal)) -
min(min(muestreal)))))/255; %halla el valor del holograma
reescalado para tener escala de grises de lo
%contrario seria solo blanca la imagen

archivo = fopen(strcat('holograma.bin'), 'w'); %guarda el
holograma en formato .bin
fwrite(archivo, hologramal, 'real*4'); % precision 4 decimales
fclose(archivo);

```

```

archivol = fopen('holograma.bin', 'r'); %abre
un archivo.bin,r especifica solo lectura
    holograma = fread(archivol, [P, P], 'real*4'); %lee un
archivo binario, lee un maximo de PxP datos, presicion 4
decimales
    fclose(archivol);
    medido = sqrt(holograma);

% Fase en el sensor

fase = zeros(P,P); %crea una matriz
de ceros de dimension PxP
campo_detector = medido.*exp(i*fase); % se mide la
amplitud

% Creando término de propagación de onda
prop = Propagador(P, longitud_de_onda, lado_area, z1);
%funcion propagadora

%reconstrucción iterativa

for kk = 1:Iteraciones
%iteraciones de 1 hasta el parametro

fprintf('Iteracion: %d\n', kk)
%muestra en la pantalla inferior el numero de iteracion
campo_detector = medido.*exp(i*fase);
%Reconstrucción de la función de transmisión t

t = IFT2D((FT2D(campo_detector)).*prop); % funcion
Transformada de Fourier centrada 2d
% funcion
Transformada de Fourier inversa centrada 2d por el propagador
am = abs(t); % devuelve el
valor absoluto Valor absoluto de cada elemento de la matriz
fa = angle(t); % devuelve los
ángulos de fase, en radianes, para cada elemento de la matriz
compleja Z.
abso = - log(am); % despejo la
abosricion de la ecuacion de transmision

%Restricción en el dominio de la muestra
for ii = 1:P
    for jj = 1:P
        if ((abso(ii,jj) < 0)) % reescribe
absorcion y fase igual a cero si los valores de abosricion son
menores a cero //revisa valores sean positi
            abso(ii,jj) = 0;

```

```

        fa(ii,jj)=0;
    end
end
end

am = exp(-abso); % reescribo sobre
am (valor abosluto)
imshow(am, [], 'colormap', 1-gray) % muestra am,
especificando el rango de visualización como un vector de dos
elementos, [bajo alto]
pause(p);

t = zeros(P,P);
for ii = 1:P
    for jj = 1:P
        t(ii,jj) = complex(am(ii,jj)*cos(fa(ii,jj)),
am(ii,jj)*sin(fa(ii,jj))); % numero comlejo a+ib
    end
end

% Cálculo del frente de onda de valor complejo en el plano
detector.

actualizo_campo_detector = FT2Dc((IFT2Dc(t)).*conj(prop)); %
funcion Transformada de Fourier centrada 2d devuelve el t
actualizado
%
funcion Transformada de Fourier inversa centrada 2d por el
propagador

amplitud = abs(actualizo_campo_detector); %
devuelve el valor absoluto Valor absoluto de cada elemento de la
matriz t
fase = angle(actualizo_campo_detector); %
devuelve los ángulos de fase, en radianes, para cada elemento de
la matriz compleja Z.

end
% Mostrar amplitud
figure('Name','Apmlitud Reconstruida','NumberTitle','off')
imshow(am, [], 'colormap', 1-gray), colorbar;

% Mostrar fase
figure('Name','Fase Recosntruida','NumberTitle','off')
imshow(fa, [], 'colormap', 1-gray), colorbar;

% Guardando amplitud reconstruida
h = - am;
h = (h - min(min(h)))/(max(max(h)) - min(min(h)));

```



```

        imwrite (h, 'amplitud_reconstruida.jpg');

% Guardando fase reconstruida
    h = - fa;
    h = (h - min(min(h)))/(max(max(h)) - min(min(h)));
    imwrite (h, 'fase_reconsttruida.jpg');

```

ANEXO 4

Modificación para variar el valor de z.

```

for aa = 1:100000
    z1 = aa*10^(-6);
    ANEXO3

    h = - am;
        h = (h - min(min(h)))/(max(max(h)) - min(min(h)));
        aux1 = num2str(z1);
        nombrel = strcat('amplitud_reconstruida', aux1);
        extension = ('.jpg');
        archivol = strcat(nombrel, extension);
        imwrite (h, archivol);

        h = - fa;
        h = (h - min(min(h)))/(max(max(h)) - min(min(h)));
        nombre2 = strcat('fase_reconstruida', aux1);
        archivo2 = strcat(nombre2, extension);
        imwrite (h, archivo2);

end

```

ANEXO 5

Código para el uso de la cámara del Raspberry pi zero W.

```

function foto_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to foto (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of
MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hint: get(hObject,'Value') returns toggle state of foto
global mypi wcam img
while get(hObject,'Value')
    img = snapshot(wcam)

    axes(handles.muestra_imagen)
    axis off

```

```

        imagesc(img)

    pause(0.2)
end
clear wcam;

% --- Executes on button press in guardar_imagen.
function guardar_imagen_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to guardar_imagen (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of
MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
global mypi wcam img
set(handles.foto, 'Value', 0)
clear all;
mypi=raspi('192.168.2.18', 'pi', 'raspberrypi')
wcam = webcam(mypi, 'mmal service 16.1 (platform:bcm2835-
v4l2):', '1280x720')
pause(5)
img = snapshot(wcam)
muestra = img;
imwrite(muestra, 'holograma.tif');

```

ANEXO 6

Código para ventana de Hann.

```

cc=(0.05.*hanning(P)).*(0.05.*hanning(P))
tt=FT2D(campo_detector)
ttt=tt.*cc
t=IFT2D(ttt.*prop)

```

ANEXO 7

Escuela Politécnica Nacional

Facultad de Ciencias

Carrera de Física

Departamento de Física

Juan Fernando Molina Morocho

Manual de Instrucciones/Usuario Microscopio Holográfico

Contenido

1. Introducción	81
2. Descripción General del Equipo	81
Dispositivo Local.....	81
Instalación de Software	81
Inicialización del Paquete Raspberry	84
Dispositivo Remoto	85
Instalación de Hardware	85
Funcionamiento del Programa.....	90
3. Adquisición de Datos	90

Introducción

Es importante leer la presente guía de instalación y ensamblaje antes de conectar y poner en funcionamiento el microscopio de holografía digital, esto garantizará el correcto funcionamiento.

Este manual es útil para futuras aplicaciones, se recomienda conservarlo.

Descripción General del Equipo

El sistema de microscopía holográfica está formado por un Raspberry pi Zero W, un sensor CMOS, un computador central, una estructura y MatLab R2018b.

Este proyecto está basado en el principio de holografía digital, permitiendo obtener una imagen de una muestra microscópica de forma digital y económica.

El Raspberry pi Zero W conectado al sensor CMOS y a la muestra conforman el dispositivo remoto el mismo que adquiere el holograma de la muestra.

Dispositivo Local

El dispositivo local consta de un computador central, donde el mapa de interferencias es recibido de manera inalámbrica al computador central en donde se realizará el procesamiento de este, con una interfaz amigable al usuario en donde se observa el proceso y progreso de la reconstrucción de la imagen de la muestra. En la interfaz existen diferentes ventanas que guiarán al usuario a través del proceso de reconstrucción.

Requisitos que debe presentar el computador:

- Sistema operativo:
 - Windows en sus versiones 7, 8, 8.1 ó 10
- Poseer instalado el programa MatLab R2018b.
- Poseer el archivo ejecutable del programa “poner nombre del archivo”

Instalación de Software

La instalación del ejecutable es necesaria antes de empezar a usar el sistema de microscopía holográfica. Una vez se tenga el archivo ejecutable de MatLab *NanoQuit_Microscopio_Holografico* en el computador, se precede a instalar desde el programa MatLab de la siguiente manera, ver Figura 2.1,

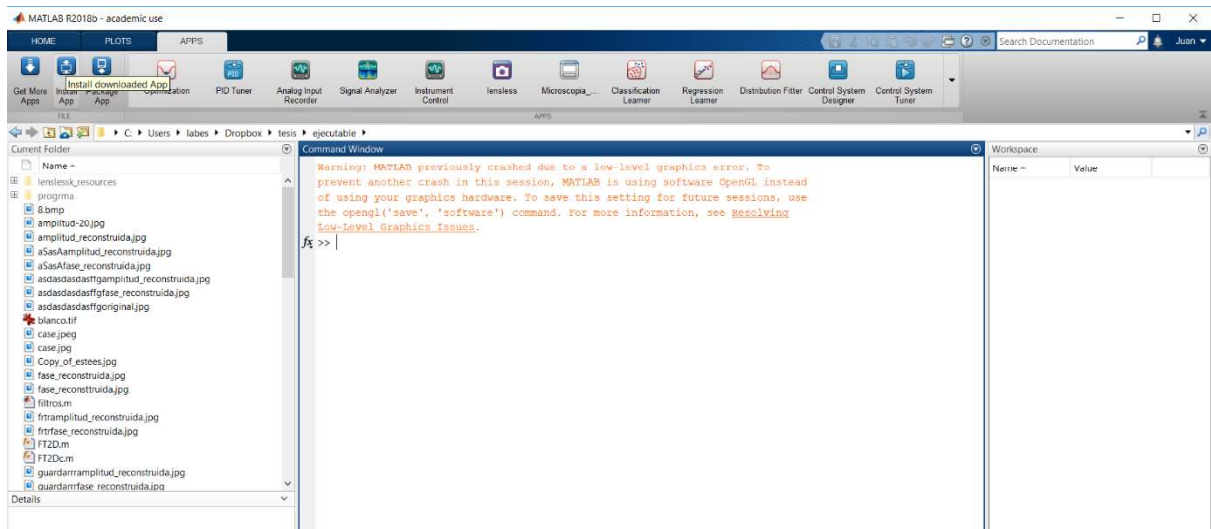


Figura 2.1 Clic en la sección “Instalar App”.

Después es necesario pulsar “Abrir” en el siguiente mensaje de instalación, ver Figura 2.2.

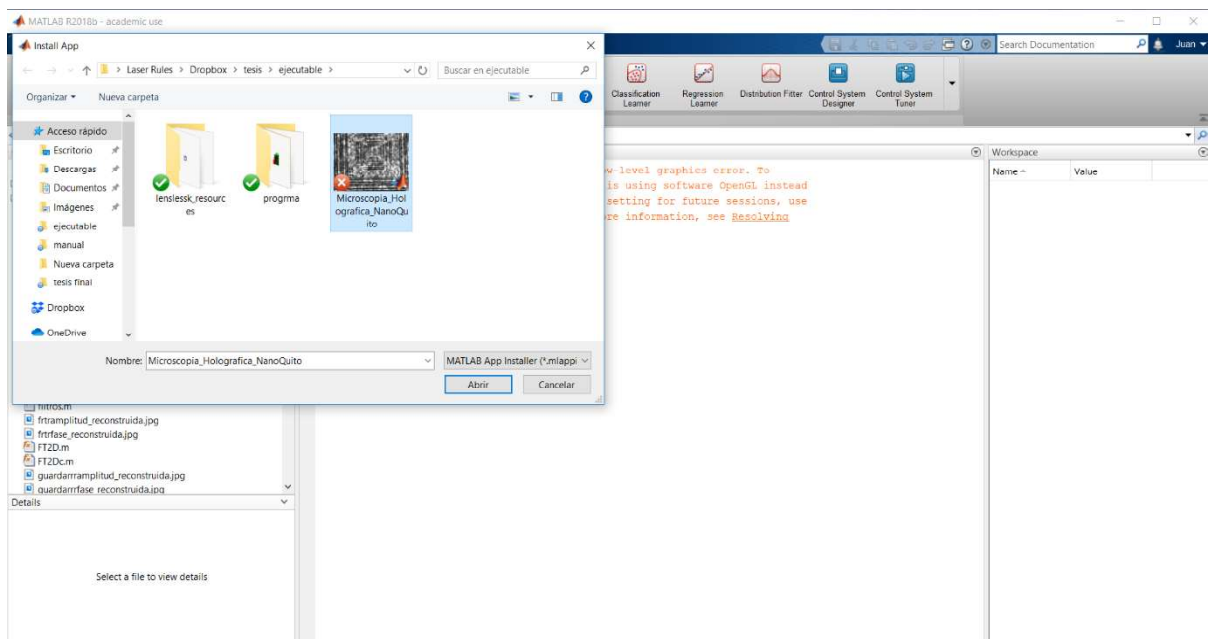


Figura 2.2 Selección del archivo de instalación.

Después se pulsa “Install” como en la Figura 2.3. Este proceso podría tardar algunos minutos.

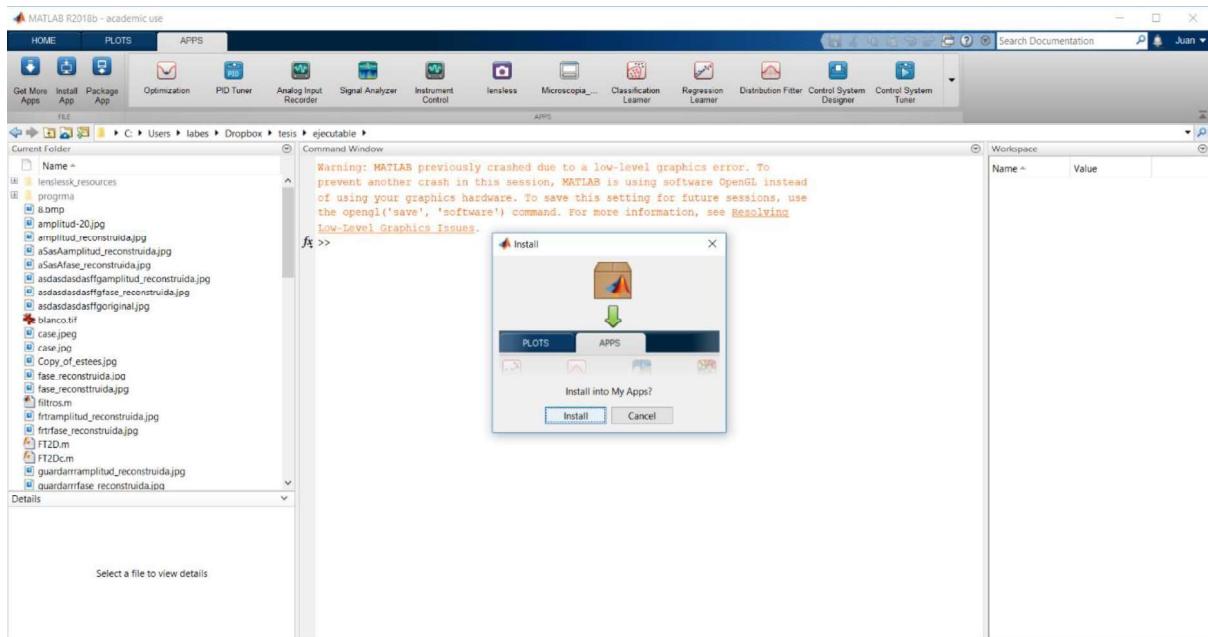


Figura 2.3 Ventana de instalación.

Una vez instalada la app, en la sección Apps de Matlabs aparecerá el programa como se observa en la Figura 2.4. Para iniciar el programa presionamos clic sobre el mismo.

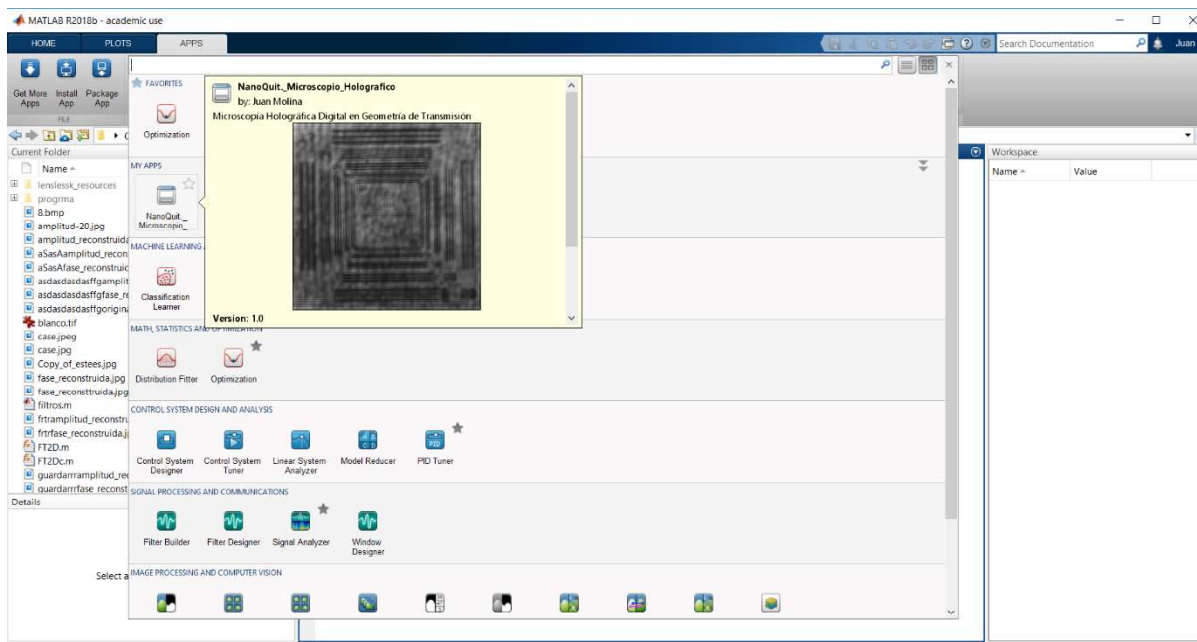


Figura 2.4 Programa Instalado.

Inicialización del Paquete Raspberry

Para poder establecer la comunicación inalámbrica con el dispositivo remoto debemos conectar la computadora central a la misma red inalámbrica de datos donde se configurará el dispositivo remoto.

Se debe instalar el paquete necesario para la conexión con el Raspberry Pi Zero W, en la sección “Add-Ons” clic sobre la opción “Get Hardware Support Packages”

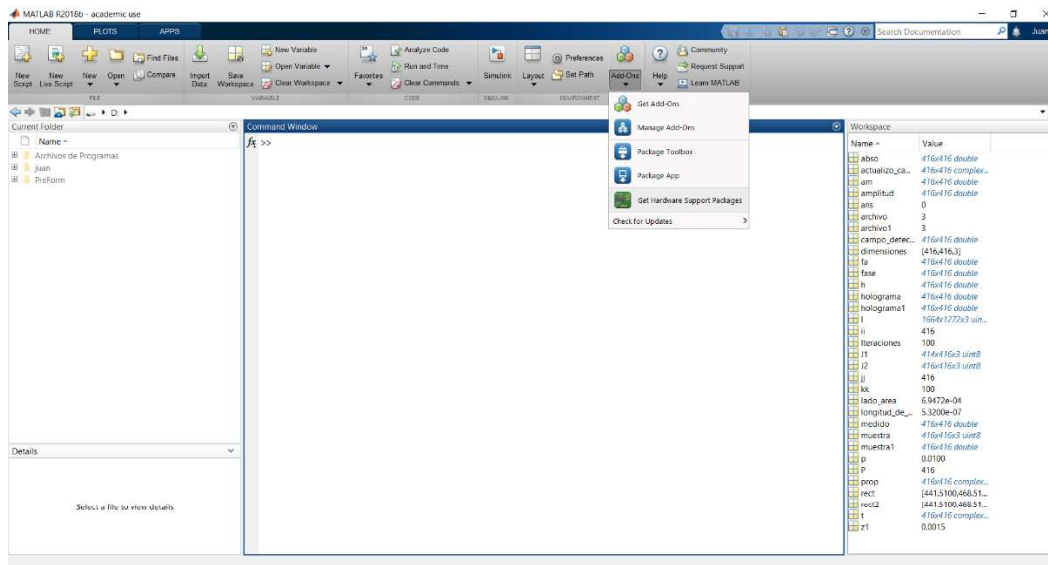


Figura 2.5 Instalar el paquete necesario para el Raspberry Pi Zero W.

Después seleccionamos la opción “MATLAB Support Package for Arduino Hardware”, ver Figura 2.6.

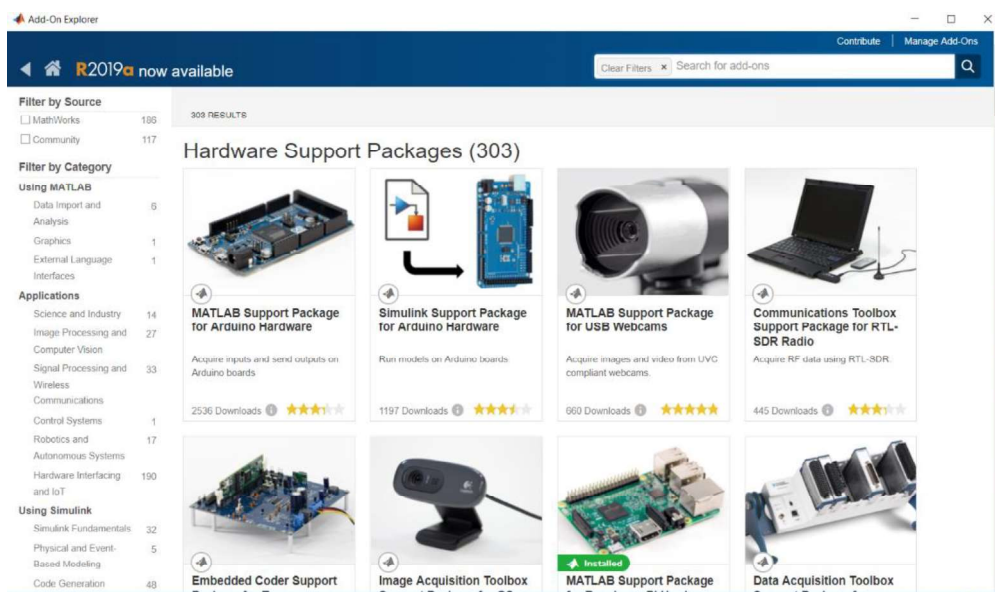


Figura 2.6 Configuración de la conexión a la red inalámbrica.

Realizado este procedimiento se sigue a instalar pulsando la opción “Install” como se observa en la Figura 2.7

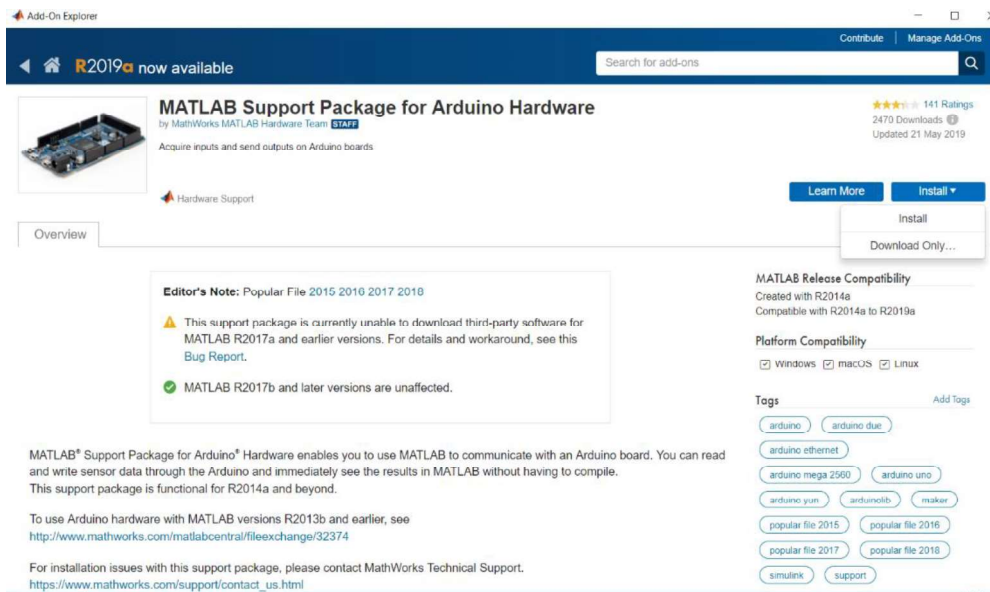


Figura 2.7 Instalación paquete Raspberry.




Dispositivo Remoto





El dispositivo remoto consta de un computador de placa reducida Raspberry Pi Zero W, un sensor óptico. El ingreso de datos se realiza mediante el dispositivo local.

Instalación de Hardware

Es necesario ensamblar todos los elementos detallados en la Tabla 3.1. Se recomienda seguir el orden sugerido en el manual.

Tabla 3.1 Componentes del Dispositivo Remoto

Componente	Raspberry Pi 3 Modelo B
Cargador para alimentación (1.2 Amp, 5.0V)	
Raspberry Pi Zero W	
Cámara para Raspberry Pi Zero W	

Pin-hole (200nm)	
Estructura impresa en 3D	
Láser Verde (532nm)	
Tarjeta MicroSD Requerimientos Mínimos 16 Gb Clase 10	

A continuación, se presenta el ensamblaje de todas las partes constitutivas

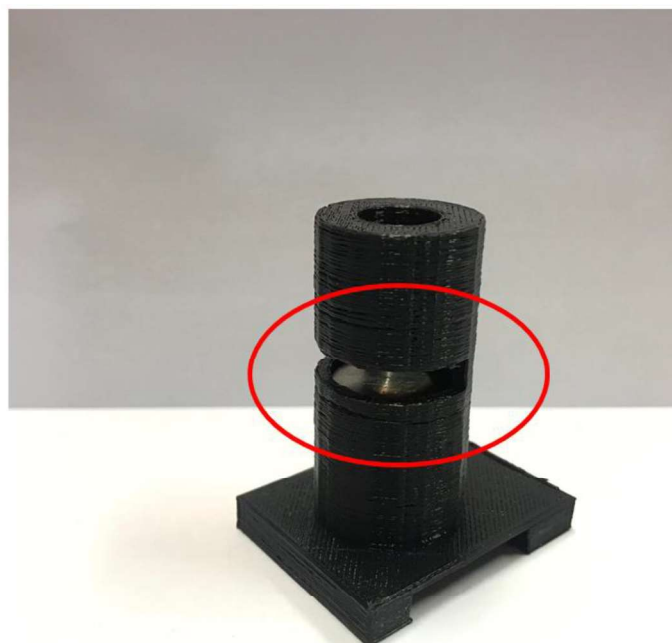


Figura 3.1 Colocar el Pin-hole en la estructura 3D.



Figura 3.2 Enroscar el láser en la estructura 3D.

Dentro de la Raspberry Pi Zero W se debe identificar el puerto para la conexión de la Tarjeta MicroSD y el puerto de la cámara. Luego se procede a conectar como se observa en la Figura 3.3.

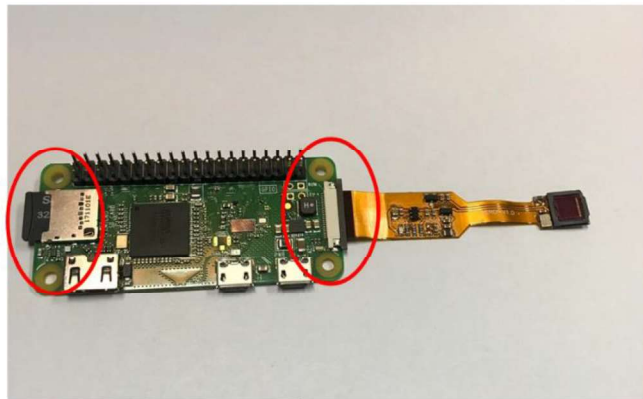


Figura 3.3 Vista superior de los puertos conectados a la Tarjeta MicroSD y a la cámara.

La Raspberry Pi Zero W se coloca sobre la estructura impresa en 3D, como se observa en la Figura 3.4, para así completar el sistema de alimentación del procesador.



Figura 3.4 Montaje sobre el sistema impreso en 3D.

Luego, se procede a fijar la Raspberry Pi Zero W sobre la estructura mediante 4 tornillos como se observa en la Figura 3.5

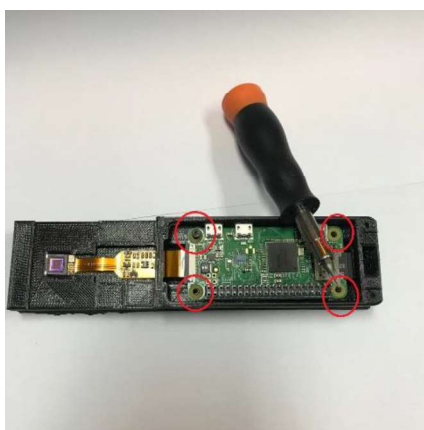


Figura 3.5 Puntos en donde se deben ubicar los tornillos Raspberry Pi.

Se procede después al montaje sobre las estructuras 3D como se muestra en las siguientes figuras.



Figura 3.6 Cobertor del láser y pin-hole.

Se debe ubicar el cobertor del Raspberry Pi Zero W como se muestra en la Figura 3.7 y se debe fijar mediante tornillos en los puntos seleccionados. Para la alimentación del láser se debe colocar el polo positivo y el polo negativo al primer y quinto GPIO respectivamente.

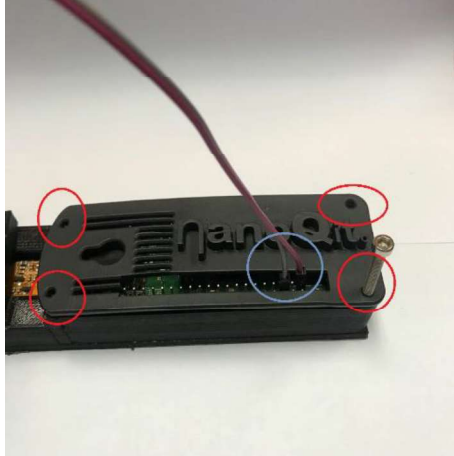


Figura 3.7 Cobertor del Raspberry Pi Zero W.

Se coloca el ensamble mostrado en la Figura 3.6 sobre la estructura armada en la Figura 3.7 y se fija mediante tornillos, como se observa en la Figura 3.8.



Figura 3.8 Ensamblaje final de las estructuras 3D.

El sistema final de microscopía holográfica se presenta en la Figura 3.9, el sistema debe estar fijado firmemente mediante los tornillos para evitar movimientos que pueden alterar en la obtención de imágenes. Finalmente se debe conectar el cargador para alimentación como se observa en el círculo rojo y la muestra se debe ubicar en la ranura señalada de verde

Esta tarjeta es introducida en la ranura para tarjetas de almacenamiento ubicada en la parte posterior de la Raspberry Pi como indica la Figura 3.9.

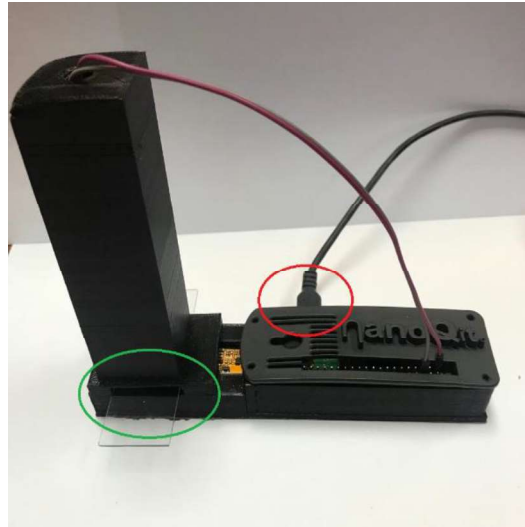


Figura 3.9 Diseño final.

Funcionamiento del Programa

Para el correcto funcionamiento del programa tanto el dispositivo remoto como el dispositivo local deben estar conectados a la misma red Wireless. Es importante no mover la muestra una vez que el programa ha empezado a capturar los hologramas.

Dependiendo de la capacidad del dispositivo local el tiempo de procesamiento puede variar. En las siguientes figuras se explica la instalación y funcionamiento del programa ejecutable en MatLAB.

Adquisición de Datos

Para iniciar la adquisición del archivo de video se debe ubicar abrir el programa “NanoQuit._Microscopio_Holografico” desde MatLAB, luego, aparecerá una pantalla como se observa en la Figura 5.1.



Figura 5.1 Pantalla de inicio.

En la pantalla de inicio existen dos opciones, “Comenzar” en la parte inferior derecha o “Salir [X]” en la parte superior derecha. En la Figura 5.2 se observa los mensajes que arroja el programa dependiendo de la opción seleccionada. Para el mensaje de salida, las opciones son las mismas en cada ventana de los distintos procesos del programa.



Figura 5.2 Interfaz para la adquisición de datos en el dispositivo remoto, mensaje de salida y mensaje de avance.

Al pulsar la opción “Si” el dispositivo remoto comenzará a conectarse al dispositivo local, durante este mensaje no se debe presionar nada. Ver Figura 5.3.



Figura 5.3 Mensaje de conexión.

Una vez conectado aparecerá la siguiente pantalla, ver Figura 5.4. En donde se visualizará, una vez iniciada la cámara, en la sección izquierda la imagen en tiempo real capturada por la cámara. En la sección derecha se presentan dos opciones: “Iniciar Cámara” que permite conectar el dispositivo local con la cámara y “Capturar” que toma una imagen de la cámara y la guarda.

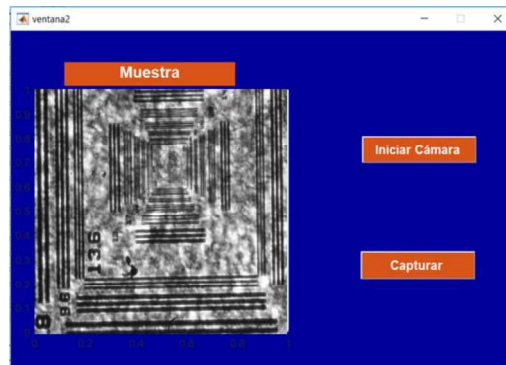


Figura 5.4 Ventana 2.

Después de pulsar “Iniciar Cámara” se procede a ubicar la muestra según se necesite, buscando q el centro de la imagen visualizada sea el centro de la muestra. Se pulsa la opción “Capturar” cuando se hay escogido el área de la muestra y aparecerá un mensaje, ver Figura 5.5, en el que se pide esperar hasta que termine el proceso.

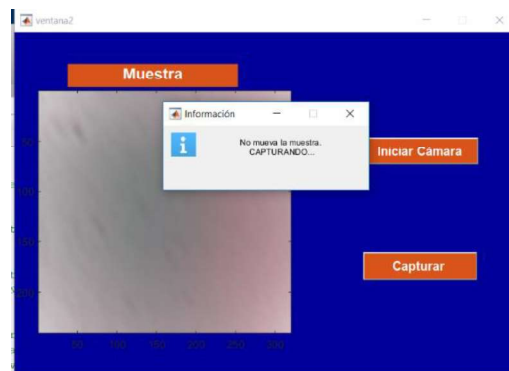


Figura 5.5 Ventana 2, mensaje de procesamiento.

Una vez terminado el proceso de captura aparecerá un mensaje en el que se pide seleccione el área de interés a reconstruir. Para seleccionar el área de interés seleccionamos con el botón izquierdo del ratón, ver Figura 5.6.

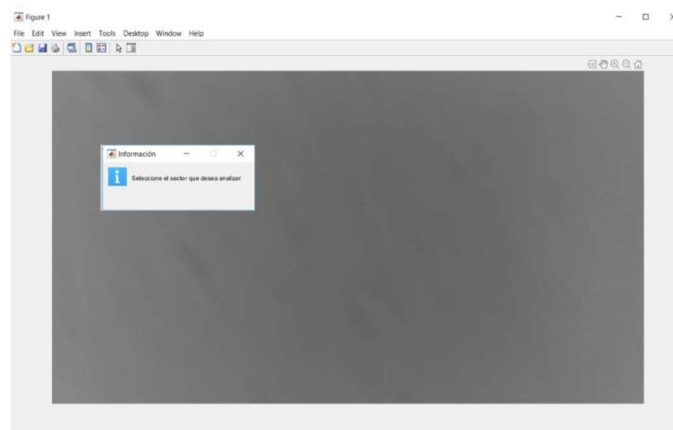


Figura 5.6 Selección del área de interés.

Con el botón izquierdo del ratón seleccionamos la opción “Crop Image”, ver Figura 5.7.

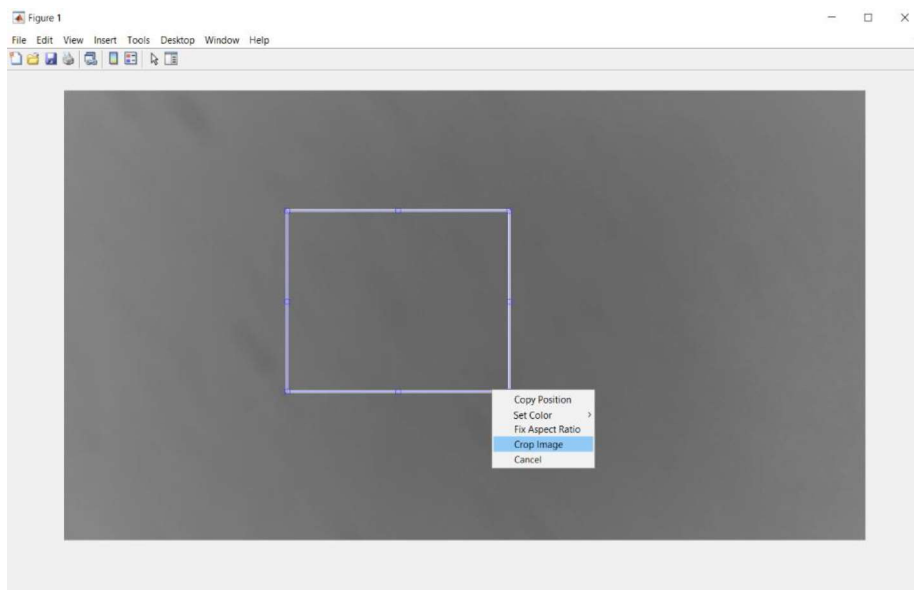


Figura 5.7 Recortar el área de interés.

En la siguiente ventana se mostrará la imagen capturada y la imagen recortada. En la parte derecha se tienen tres opciones: “Volver a Recortar” si se necesita otra área de interés, “Volver a Capturar” si se necesita capturar otra imagen y “Procesar” si se desea procesar la imagen antes recortada.



Figura 5.7 Ventana 3.

En la siguiente ventana se presentarán los resultados del procesamiento de la imagen recortada, ver Figura 5.8.

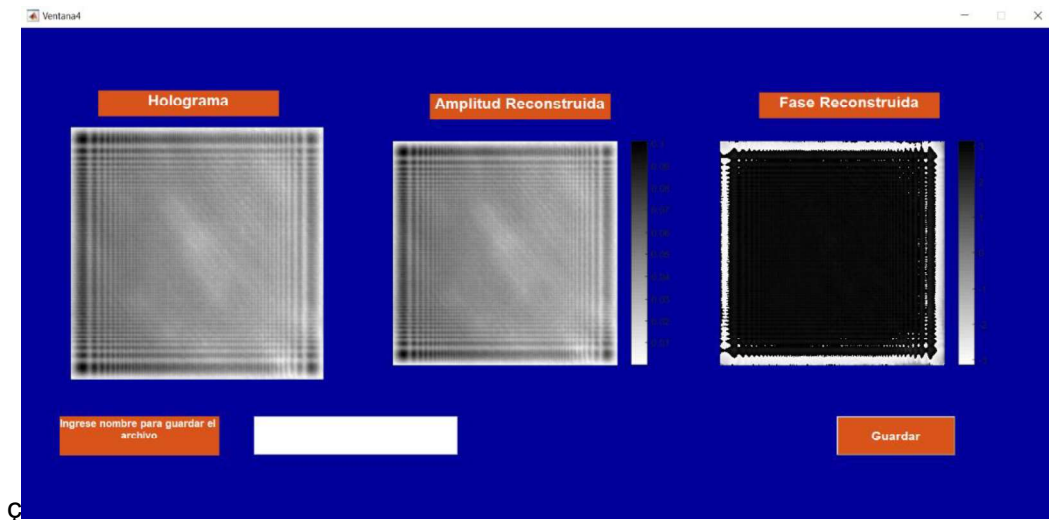


Figura 5.8 Ventana 4.

Finalmente, en el espacio en blanco se ingresa el nombre con el que se quiere guardar la imagen procesada y se pulsa “Guardar”, ver Figura 5.9.

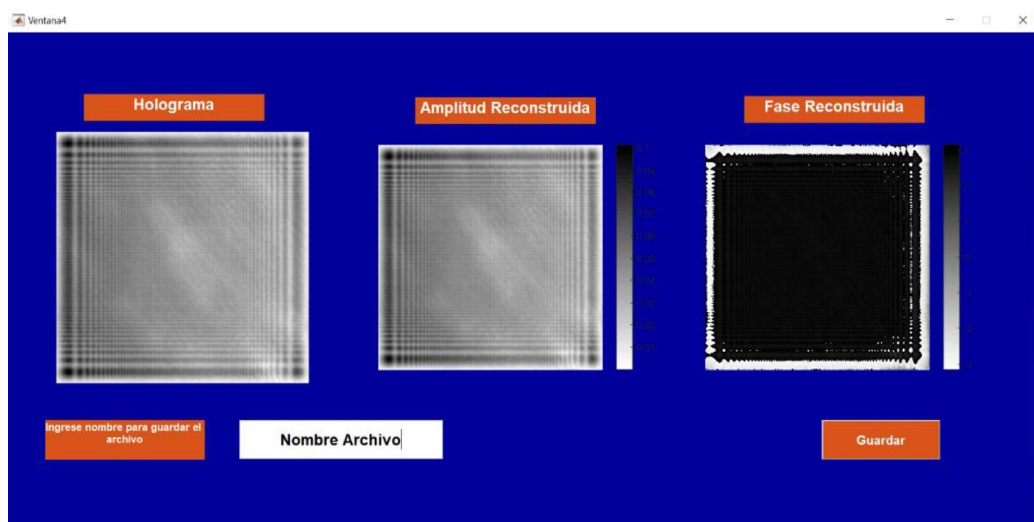


Figura 5.9 Guardar Archivo.