

MEDICIÓN 3D DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE MICROESFERAS POR UNA TÉCNICA COMBINADA DE MICROSCOPIA HOLOGRÁFICA DIGITAL Y TOMOGRAFÍA

3D MEASUREMENT OF REFRACTIVE INDEX IN MICROSPHERES BY USING BOTH DIGITAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPY AND TOMOGRAPHY TECHNIQUES

Fredy Monroy¹, Miguel Orjuela¹, Jorge García-Sucerquia²

¹ Departamento de Física, Grupo de óptica Aplicada, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

² Escuela de Física, Grupo de óptica, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Resumen

Las microesferas de vidrio son objetos translucidos que sirven como patrón para caracterizar diferentes técnicas para la medición de objetos de fase. Estas microesferas son de gran importancia en la valoración de técnicas metrológicas, tanto a nivel industrial como a nivel médico y científico, en la medición del índice de refracción. En este trabajo se muestran los resultados del uso de una técnica que combina la Microscopía Holográfica Digital en transmisión, con la técnica de reconstrucción tomográfica, por medio de la aplicación de la transformada inversa de Radón, tomando como insumo los mapas de diferencia de fase obtenidos del procedimiento de registro y reconstrucción holográfica. La aplicación de esta técnica permite obtener los mapas 3D de índice de refracción de esferas de vidrio de diámetros de alrededor de 200 micrómetros.

Palabras claves: Índice de refracción, Microscopía, Holografía Digital, Tomografía.

Abstract

The glass beads are translucent objects that serve as a pattern to characterize different techniques for measuring phase object. These microspheres are of great importance in assessing metrological techniques, both industrial as medical and scientific level, in the measurement of refractive index. This paper shows the results acquired by using a technique that combines both Digital Holographic Microscopy in transmission and the tomographic reconstruction technique, applying inverse Radon transform. As input were taken the difference phase maps obtained from the registration procedure and holographic reconstruction. The application of this technique allows obtaining 3D maps of the refractive index of glass spheres with diameters of about 200 micrometers.

Keywords: Refractive Index, Microscopy, Digital Holography, Tomography.

Introducción

Microscopía Holográfica Digital

Para la caracterización física de algunas propiedades de un objeto semitransparente es posible hacer uso de una moderna herramienta como lo es la Microscopía Holográfica Digital. Esta herramienta interferométrica nos permite registrar y extraer información del índice de refracción y tamaño del objeto a partir de la información del mapa de diferencia de fase reconstruido numéricamente, iniciando desde el registro de patrones de interferencia de campos ópticos coherentes registrados ópticamente. Esta técnica ha sido implementada con variados propósitos, por ejemplo, hacer estudios de capilares, caracterización de fibras ópticas, o hacer estudios de muestras biológicas estudiando mayormente su índice de refracción [1].

En holografía digital se realiza el registro del campo óptico complejo en un sensor de estado sólido, utilizando montajes interferométricos tipo Mach-Zhender o tipo Michelson, dependiendo

de la naturaleza del objeto a estudiar, para objetos opacos se trabaja en reflexión y para objetos traslúcidos en transmisión. Lo que normalmente se registra es la interferencia entre una onda de referencia $R(x, y)$ y una onda que porta la información del objeto $O(x, y)$, respectivamente dadas por

$$O(x, y) = |O(x_h, y_h)| \exp[-iO(x_h, y_h)] \quad (1)$$

$$R(x, y) = |R(x_h, y_h)| \exp[-i\phi(x_h, y_h)] \quad (2)$$

Donde el subíndice h representa la ubicación del plano holograma y $O(x_h, y_h)$ y $\phi(x_h, y_h)$ son las respectivas fases de las ondas objeto y referencia. La intensidad de la superposición de estos dos campos será proporcional al cuadrado de la suma de los mismos [2] es decir:

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

$$I(x, y) = O^2 + R^2 + 2OR \cos[O(x_h, y_h) - \phi(x_h, y_h)] \quad (4)$$

En la ecuación (4) los dos primeros términos representan las intensidades de la onda objeto y de referencia individualmente, y el tercer término describe la interferencia de los mismos [2]. Este término modula de forma cosenoidal la distribución de intensidad $I(x, y)$, y su fase está determinada por la diferencia entre las fases objeto $O(x_h, y_h)$ y referencia $\phi(x_h, y_h)$. Es así como se registra la información referente a la amplitud y la fase de las ondas que interfieren en un soporte físico llamado holograma o registro holográfico.

Posterior al registro, se realiza la reconstrucción del campo óptico complejo haciendo el cálculo numérico de la integral de difracción. Para dicho cálculo, dependiendo de las condiciones experimentales de registro (longitud de onda utilizada, distancia objeto-sensor, tamaño del objeto) se utiliza la aproximación de Fresnel, la aproximación por convolución o como en el caso concreto de este trabajo, la aproximación por espectro angular. En esta aproximación se hace la representación de los frentes de onda en términos de ondas planas para generar la imagen requerida en un plano dado. Si un frente de onda en un plano z arbitrario es $O(x, y, z)$ su espectro

angular se obtiene al tomar su transformada de Fourier, que viene dada por [3]

$$A(k_x, k_y, z) = A(k_x, k_y, 0) \exp[i(k_z z)] \quad (5)$$

Donde $k_z = \sqrt{(k^2 - k_x^2 - k_y^2)}$, k_x, k_y son las componentes cartesianas del vector de onda \mathbf{k} , cuyo módulo está dado por $|k| = 2\pi/\lambda$ y su dirección es la dirección de propagación de la onda.

Por tanto, el frente de onda objeto total en un plano perpendicular a la dirección de propagación z está dado por la transformada inversa de Fourier, de su correspondiente espectro angular propagado, esto es:

$$O(x, y, z) = \iint A(k_x, k_y; z) \exp[i(k_x x + k_y y)] dk_x dk_y \quad (6)$$

Esta última expresión corresponde al campo óptico complejo reconstruido y contiene la información de la intensidad y la fase del frente de onda objeto para una distancia z específica, las cuales están dadas respectivamente, por [2]:

$$I(x, y, z) = |O(x, y, z)|^2, \Delta\phi(x, y, z) = \arctan \frac{\text{Im}[O(x, y, z)]}{\text{Re}[O(x, y, z)]} \quad (7)$$

La parte de la ecuación (7) que permite el cálculo de la fase está definida mediante una función arcotangente la cual tiene discontinuidad cada 2π a esto se le llama fase envuelta módulo 2π , esto nos conduce a hacer correcciones de dichos saltos, para lo cual se debe implementar un algoritmo numérico de desenvolvimiento de fase [4].

La expresión que relaciona la diferencia de fase con el índice de refracción del objeto en estudio $n_s(x, y, z)$ y la longitud de camino recorrido dentro de él $D(x, y, z)$, cuando el objeto está rodeado por un medio cuyo índice de refracción se aproxima a uno, viene dada por[5]:

$$\Delta\phi(x, y, z) = \frac{2\pi}{\lambda} [n_s(x, y, z) - 1] D(x, y, z) \quad (8)$$

Donde $\Delta\phi(x, y, z)$ representa la diferencia de fase, λ la longitud de onda del haz utilizado, $n_s(x, y, z)$ el índice de refracción y $D(x, y, z)$ la distancia recorrida por la luz dentro del objeto (espesor de la muestra).

Tomografía

El proceso tomográfico convencional consta básicamente de dos pasos: El primer paso consiste en obtener las proyecciones del objeto a estudiar “iluminándolo” (haciéndole incidir un campo) a diferentes ángulos y registrando las intensidades del campo transmitido, obteniendo así un mapa de “opacidades” a diferentes ángulos, normalmente entre 0° y 180° , esto típicamente se realiza por medio de la transformada de Radón. El segundo paso consiste en “reconstruir” el mapa 3D de “opacidades” del objeto a partir de las proyecciones registradas en el paso anterior, esto se logra, recuperando el campo total transmitido en las diferentes direcciones, el cual para fuentes no difractivas, típicamente se calcula utilizando la transformada inversa de Radón. La transformada de Radón de una función $f(x, y)$, denotada como $g(s, \theta)$, es definida como su integral de línea a lo largo de una línea inclinada en un ángulo θ desde la abscisa y y a una distancia s desde el origen. Para obtener la reconstrucción de una imagen se debe hacer el cálculo de la transformada inversa de Radón de $g(s, \theta)$, uno de los caminos para encontrar dicha transformada inversa es utilizar el teorema de retroproyección filtrada [6, 7].

Dado $g(s, \theta) := Rf$, $-\infty < s < \infty$, $0 \leq \theta < \pi$, su transformada de Radón es:

$$f(x, y) = \left(\frac{1}{2\pi^2} \right) \int_0^\pi \int_{-\infty}^\infty \frac{[(\partial g / \partial s)(s, \theta)]}{x \cos \theta + y \sin \theta - s} ds d\theta \quad (9)$$

Procedimiento y arreglo experimental

En general el procedimiento realizado se llevó a cabo desarrollando dos etapas: Etapa I: Etapa holográfica. Etapa II: etapa tomográfica. A su vez la primera etapa, la etapa holográfica, consiste

en dos grandes pasos: el registro óptico de los hologramas a diferentes ángulos (Con ayuda de un motor de paso se registraron 100 hologramas desde 0° hasta 180° , en pasos de $1,8^\circ$) y el segundo paso es la reconstrucción digital de los hologramas, a partir de los cuales se pudo obtener el mapa de diferencia de fase para el objeto iluminado a los diferentes ángulos. Para el registro óptico se realizó un montaje interferométrico en transmisión tipo Mach Zehnder modificado como el que se representa a continuación:

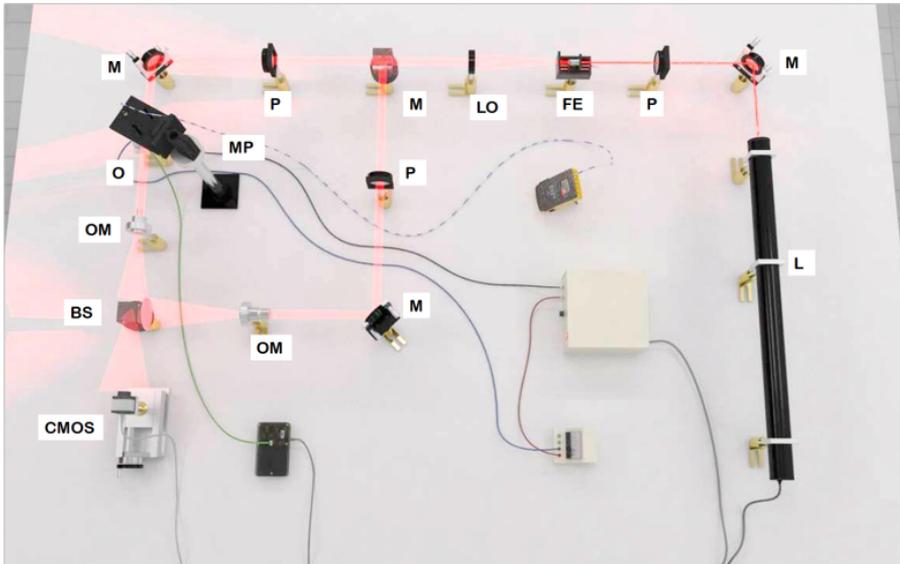


FIGURA 1. **L**: Láser. **M**: Espejo. **P**: Polarizador. **FE**: Filtro Espacial. **LO**: Lente. **MP**: Motor de paso. **O**: Objeto. **OM**: Objetivos de microscopio **BS**: Divisor de haz. **CMOS**: Cámara.

Como fuente de luz coherente para iluminar el interferómetro se utilizó un láser (**L** en la figura 1) de HeNe de 632.8 nm de longitud de onda y con una potencial nominal de 35 mW, el haz pasa luego por un sistema de colimación el cual lo convierte en un frente de onda plano, posteriormente pasa por un cubo divisor de haz **BS** que divide el haz incidente en dos haces, haz objeto **HO** y haz de referencia **HR**, en el camino óptico del haz objeto se encuentra el objeto, que para el caso aquí estudiado son microesferas de sílice. El haz transmitido por las microesferas, pasa luego por un objetivo de microscopio **OM** que se usa para magnificar la imagen del ob-

jeto, posteriormente el haz pasa a un segundo cubo divisor de haz donde se reúnen de nuevo los haces objeto y referencia para generar el patrón de interferencia que será registrado en la cámara **CMOS**. El proceso de registro comienza tomando un holograma de referencia el cual se obtiene registrando el patrón de interferencia entre **HO** y **HR** sin el objeto, posteriormente se coloca el objeto y se registran los 100 hologramas en los diferentes planos entre 0° y 180° . Dado que tanto en el haz de referencia como en el haz objeto se encuentran objetivos de microscopio, las franjas de interferencia son curvas (portadores esféricos) que adicionan una curvatura adicional al frente de onda del objeto, el cual es necesario compensar, en este caso nuestra compensación se hace experimentalmente, mediante la resta de la fase reconstruida para el objeto y la fase reconstruida sin el objeto. Para reconstruir numéricamente el campo óptico, primero se realiza un filtro de Fourier con la finalidad de trabajar un solo orden de difracción, posteriormente se propaga el campo utilizando la aproximación del espectro angular, esto debido a que las distancias de propagación son del orden de los micrómetros, de esta forma se obtiene el campo propagado y con la ayuda de la ecuación (7) se obtiene la intensidad y el mapa de diferencia de fase del holograma, el cual es sometido a su respectivo proceso de desenvolvimiento. Una vez obtenido el mapa de fase con ayuda de la ecuación (8), se calcula de índice de refracción de las microesferas $n_s(x, y)$, asumiendo para ellas un diámetro de $200 \pm 5 \mu\text{m}$, ya que este fue medido previamente por microscopía óptica, este procedimiento se realiza con los 100 registros realizados para la esfera en todas sus posiciones de rotación.

Para llevar a cabo la etapa tomográfica, se tomaron como insumo los 100 mapas de índice de refracción $n_s(x, y)$ y con ayuda de la transformada inversa de radón se obtuvo el mapa 3D de índice de refracción.

Resultados y Análisis

Partiendo de la ecuación (8) y con las magnitudes utilizadas en el experimento, se obtuvo la relación:

$$n(x, y) = 1 + 0,000050356 * \Delta\phi(x, y). \quad (10)$$

Al realizar el procedimiento completo de reconstrucción holográfica y reconstrucción tomográfica descrito anteriormente, se obtuvieron los mapas de índice de refracción mostrados en la figura 2. La figura 2(a) muestra la reconstrucción 2D de uno de los mapas de índice de refracción, el cual fue calculado utilizando la expresión (10) a partir del mapa de diferencia de fase, la figura 2(b) muestra el respectivo mapa 3D de índice de refracción; en la figura 2(c) se muestra un perfil diametral del índice de refracción, trazado a lo largo de la línea azul mostrada en la figura 2(a), de esta imagen se puede observar que para el ancho de los 200 μm el valor del índice de refracción es de $n_{exp}Fase = 1,51 \pm 0,01$.

Al realizar el proceso de reconstrucción tomográfica del índice de refracción utilizando todas las imágenes obtenidas en la rotación de la microesfera, se obtuvo el mapa de índice de refracción mostrado en la figura 3(a), un esquema del mapa 3D de índice de refracción se muestra en la figura 3(b), una cuantificación del mismo es mostrada en la imagen de la figura 3(c). Al realizar un corte diametral a lo largo de la línea roja mostrada en la figura 3(a), se encuentra que el perfil de índice de refracción mostrado en la figura 3(d) da un valor de $n_{exp}Tomog = 1,57 \pm 0,01$. Tomando como referencia el valor teórico de $n_{Teorico} = 1,457$ [8], se obtienen respectivamente los errores porcentuales de $\%E(n_{exp}Fase) = 3,6\%$; $\%E(n_{exp}Tomog) = 7.7\%$, los cuales están dentro de un buen margen de tolerancia. Es de resaltar que el valor de $n_{exp}Fase$ solo proporciona información en un plano, mientras que el valor de $n_{exp}Tomog$ proporciona información en 3D, ya que este es el resultado de aplicar la transformada inversa de Radon sobre los mapas de índice de refracción bidimensionales.

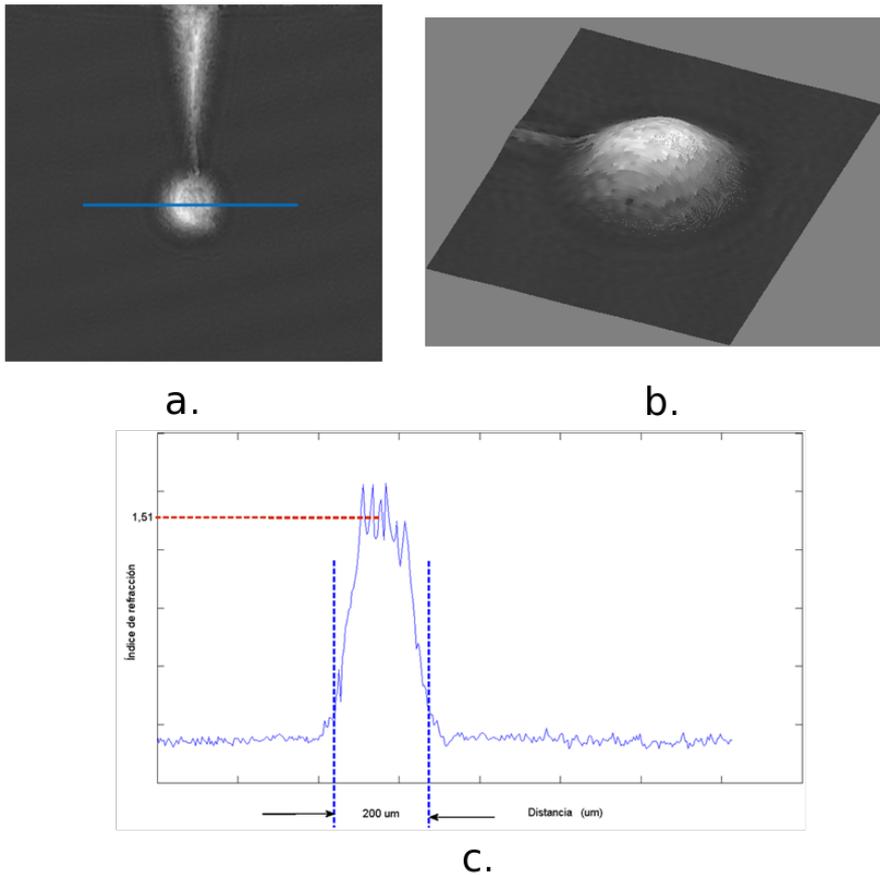


FIGURA 2. (a) Mapa de índice de refracción para la microesfera, obtenido a partir del mapa de diferencia de fase en una de las direcciones de iluminación. (b) representación 3D del mapa anterior. (c) Perfil del índice de refracción realizado a lo largo de la línea azul de la figura 2(a), donde se observa que para el diámetro de $200 \mu\text{m}$ el valor medio del índice de refracción es de $n_{exp}^{Fase} = 1,51 \pm 0,01$.

Conclusiones

A partir de los mapas de diferencia de fase obtenidos por medio de MHD, se puede obtener el valor numérico del índice de refracción en un determinado plano de iluminación, si se conoce la geometría del objeto a estudiar, para el caso el diámetro de las microesferas; mientras que realizando la reconstrucción tomográfica utilizando

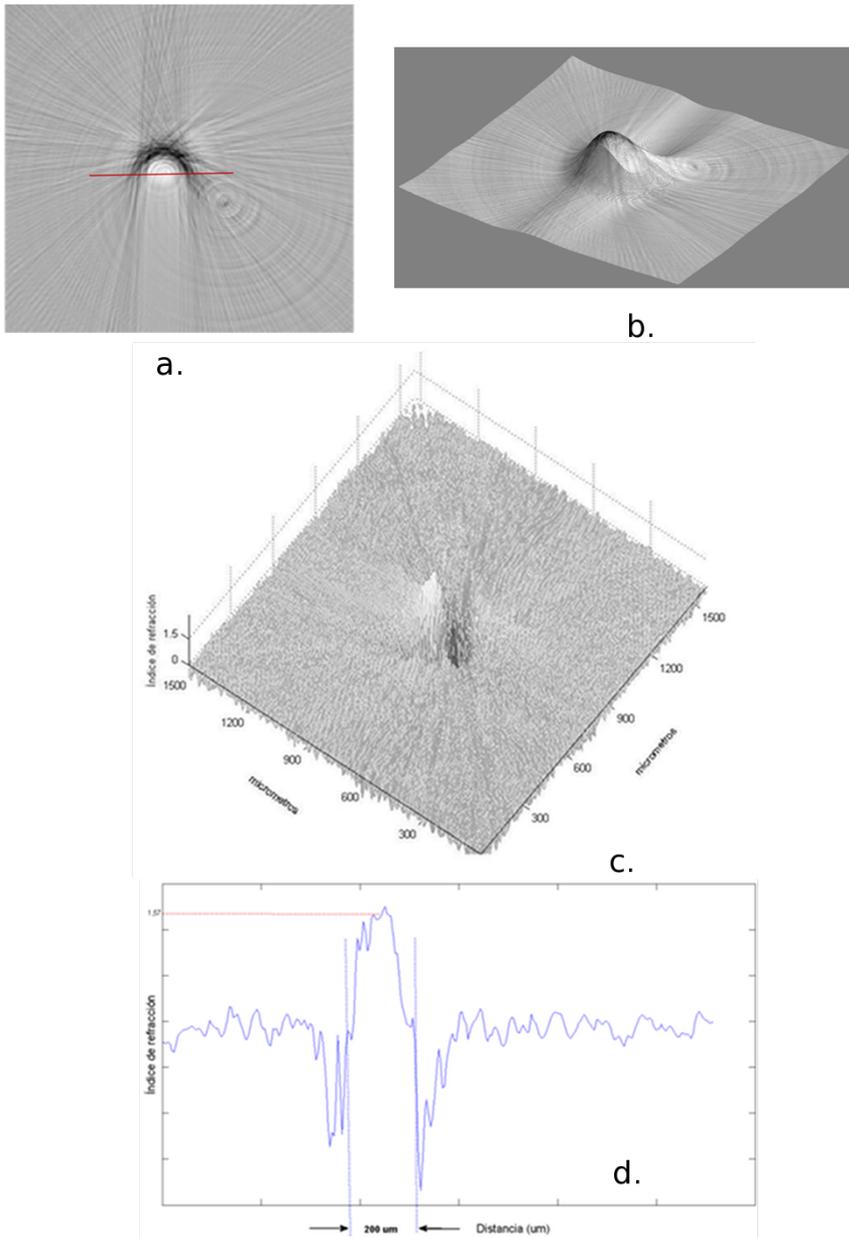


FIGURA 3. (a) Reconstrucción tomográfica del índice de refracción para la microesfera. (b) representación 3D del mapa anterior. (c) Imagen 3D del mapa tomográfico de índice de refracción, cuantificando el valor del índice. (d) Perfil del índice de refracción realizado a lo largo de la línea azul de la figura 3(a), donde se observa que para un diámetro de $200 \mu\text{m}$ el valor medio del índice de refracción es de $n_{exp} Fase = 1,57 \pm 0,01$.

como insumo los mapas 2D de índice de refracción, se obtiene el valor numérico de dicho índice con información completa en 3D. Lo anterior permite concluir que al acoplar la técnica de MHD con la tomografía, es posible obtener la información numérica completa del índice integral de refracción de objetos translucidos, por lo tanto la fortaleza de esta técnica se puede expandir a la caracterización de muchos otros tipos de objetos semitransparentes, incluyendo muestras biológicas. El error porcentual en la medición del índice de refracción integral 3D, se puede disminuir minimizando el error en el posicionamiento del objeto al centrarlo en el eje del motor de paso que ayuda en su rotación.

Referencias

- [1] P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb, and C. Depeursinge, *Opt. Lett.* **30**, 468 (2005).
- [2] U. Schnars and W. Jueptner, *Digital Holography: Digital Hologram Recording, Numerical Reconstruction, and Related Techniques* (Springer, 2005).
- [3] C. Mann, L. Yu, and M. Kim, *BioMedical Engineering OnLine* **5**, 21 (2006).
- [4] D. Ghiglia and M. Pritt, *Two-dimensional phase unwrapping: theory, algorithms, and software*, Wiley-Interscience publication (Wiley, 1998).
- [5] T. Poon, *Optical Scanning Holography With Matlab* (Springer, 2007).
- [6] A. Kak and M. Slaney, *Principles of computerized tomographic imaging* (IEEE Press, 1988).
- [7] A. Jain, *Fundamentals of digital image processing*, Prentice-Hall information and system sciences series (Prentice Hall, 1989).
- [8] SiliconFarEast, “<http://www.siliconfareast.com/sio2si3n4.htm>,” (2004).

(Recibido: 03/2010. Aceptado: 05/2010)