

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Departamento de Óptica



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES  
Nº Registre .....  
DATA 11-07-2008  
SIGNATURA  
TD-F 567  
Nº LIBIS: j 20747226

*24 am*

**Diseño de técnicas de inmunización  
contra la aberración esférica  
en microscopía**

Memoria presentada por  
**Isabel M<sup>a</sup> Escobar García**  
para optar al grado de  
**Doctora en Física**

Mayo 2008



UMI Number: U607768

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607768

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



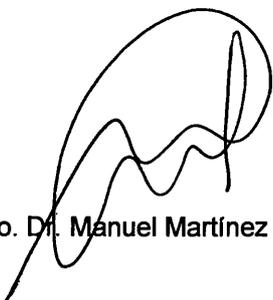
ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346



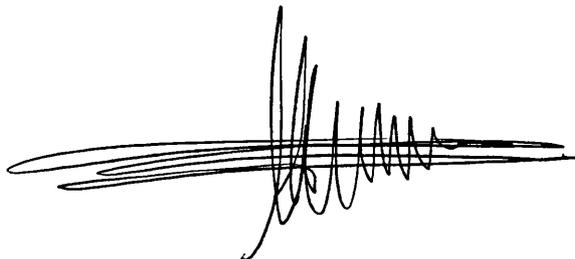
D. Manuel MARTÍNEZ CORRAL y D. Genaro SAAVEDRA TORTOSA,  
Catedrático de Universidad y Profesor Titular de Universidad, respectiva-  
mente, del Departamento de Óptica de la Universitat de València

CERTIFICAN que la presente memoria, *Diseño de técnicas de inmuni-  
zación contra la aberración esférica en microscopía*, resume el trabajo de  
investigación realizado, bajo su dirección, por D<sup>a</sup> Isabel M<sup>a</sup> ESCOBAR  
GARCÍA y constituye su Tesis para optar al Grado de Doctora en Física.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el  
presente certificado en Valencia, a diez de abril de dos mil ocho.



Fdo. Dr. Manuel Martínez Corral



Fdo. Dr. Genaro Saavedra Tortosa



***A mis padres  
y a Daniel***





*Si crees realmente en ti mismo,  
no habrá nada que esté fuera de tus posibilidades.*

Wayne W. Dyer



## **Agradecimientos**

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer su apoyo y confianza en la realización de este trabajo, ya que sin ellas estas páginas no tendrían sentido.

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis Directores de Tesis, Manuel Martínez y Genaro Saavedra por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos. A Manuel Martínez, un ejemplo a seguir como investigador, por todo el tiempo que me ha dedicado, por sus buenos consejos y valoraciones y, como no, por su constante preocupación por este trabajo. A Genaro Saavedra, por su insustituible ayuda sobre todo en el campo experimental, por transmitirme su afán de superación y su aptitud de que todo es alcanzable. A ambos, muchas gracias por la confianza que habéis depositado en mi.

Muchísimas gracias también a todos los compañeros del grupo Óptica de Fourier por su ayuda, compañía y simpatía, especialmente a Pedro y Amparo, dos personas fundamentales en el Grupo, por su constante preocupación por todo y todos. A los más jóvenes, Héctor, Emilio y especialmente a Arnau, por todas las horas compartidas en el laboratorio. A Raúl, por su gran amistad desde el primer día de universidad en el que nos conocimos. A Laura, la alegría del departamento, por esa espontaneidad que la caracteriza y por sus constantes mimos en todo momento. A Teresa, mi colega, mi amiga, mi confidente, gracias por todo. A Felipillo, nuestro colombiano particular, por su dulzura y simpatía.

A todos los que ya habéis partido para encontrar vuestro sitio, Mayte, Cristina y Víctor. Especialmente a Cristina, mi referencia todos estos años, por su incondicional ayuda en cualquier momento. Sin ti, nada hubiese sido igual. Muchísimas gracias por todo lo que hemos compartido, tanto en lo profesional como en lo personal, eres un ejemplo a seguir en muchos aspectos. Tampoco puedo olvidarme de Vicente Durán, los amigos de mis amigas son mis amigos, por los momentos compartidos.

De merecida mención son mis compañeras de piso, las de ayer y las de hoy, junto con Vicent, nuestro *okupa* particular, por todas las horas compartidas en los últimos diez años, que no tienen desperdicio ninguno. Y muy especialmente a Vicky, una de las personas más buenas que conozco que es como *mi hermana*, por su apoyo, su ayuda, su amistad, su confianza..., por todo el camino recorrido juntas. Gracias por mostrarme la vida desde otro punto de vista.

También quiero dedicarles unas líneas en estas páginas a mis amigos del *poblado*, que directa o indirectamente siempre han depositado su confianza en mí. Son de destacar las figuras de July y Marga, siempre presentes en mi corazoncito porque sin ellas, la vida tendría otro color.

I would like to thank Peter Török for giving me the chance to travel to London and spend three wonderful months there, for welcoming me into his lab, for always caring about my welfare, for his interest in my education and for always encouraging me in my dreams.

Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario AP2003-4191, que he disfrutado durante estos años.

Y como los últimos serán los primeros, las últimas líneas quiero dedicarlas para expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia. A mis padres, por todos los valores que me habéis transmitido, por vuestro apoyo y confianza en todas mis decisiones y porque todo lo que soy es gracias a vosotros. Y a mis hermanos, el mejor regalo que me han dado mis padres, por valorarme y hacerme sentir grande, gracias por estar siempre ahí. Me siento muy orgullosa de todos y cada uno de vosotros.

Finalmente, millones de gracias a Daniel, mi luna, mis sueños, mi magia. Gracias por estar cerca aún estando lejos, por tu incondicional ayuda en todo lo que hago, por levantarme cuando caigo. Yo, cerca de ti, con mis pensamientos, con mi corazón, con la luna. *L.B.L*

A todos vosotros, MUCHÍSIMAS GRACIAS, sin vuestra colaboración este trabajo no hubiese tenido sentido.

*La gratitud en silencio no sirve a nadie*

G.B. Stern



# ÍNDICE GENERAL

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Motivaciones y objetivo general .....	1
1.2. Esquema general .....	6
<b>2. Focalización de haces polarizados</b> .....	<b>9</b>
2.1. Formación de imágenes 3D en sistemas telecéntricos .....	10
2.1.1. Aproximación paraxial.....	10
2.1.2. Objetivos de apertura numérica alta .....	14
2.2. Teoría escalar de Debye .....	16
2.3. Teoría vectorial de Debye .....	20
2.3.1. Matrices de Jones generalizadas .....	20
2.3.2. Integral de Debye-Wolf .....	22
2.4. El fenómeno de despolarización .....	27
<b>3. Efecto de la aberración esférica en sistemas con apertura numérica alta</b> .....	<b>33</b>
3.1. Aberración introducida por un medio estratificado.....	34
3.1.1. Medio con una interfase.....	35
3.1.2. Medio con dos interfases .....	37
3.1.3. Medio con N-1 interfases .....	39

3.2. Aberración introducida por variaciones en la longitud de tubo.....	39
3.3. Desarrollo en serie de la función de aberración: aberración esférica primaria .....	41
3.3.1. Medio estratificado .....	41
3.3.2. Variaciones en la longitud de tubo .....	43
3.4. Distribución focal de amplitudes con aberración esférica .....	45
3.4.1. Sistemas con apertura numérica alta.....	45
3.4.2. Aproximación paraxial .....	48
3.5. Analogía entre aberración esférica y difracción 1D.....	50
3.6. Análisis de la sensibilidad a la aberración esférica de algunas pupilas.....	53
3.6.1. Pupila gaussiana invertida.....	53
3.6.2. Filtros parabólicos .....	62
<b>4. Variación de parámetros estadísticos espectrales bajo distorsiones de fase .....</b>	<b>67</b>
4.1. Funciones continuas.....	69
4.1.1. Definición de parámetros.....	69
4.1.2. Transformación de momentos espectrales frente a variaciones de fase .....	72
4.1.3. Transformación de la varianza espectral .....	75
4.2. Funciones con discontinuidades finitas .....	77
4.2.1. Presentación del problema.....	78

4.2.2. Formalismo de los momentos de segundo orden generalizados.....	79
4.2.3. Transformación de momentos y varianza espectrales.....	84
4.3. Analogía formal: $\sigma_x^2(z)$ y $\sigma_{z_N}^2(w_{40})$ .....	86
<b>5. Técnicas de conformado para incrementar la tolerancia a la aberración esférica.....</b>	<b>91</b>
5.1. Diseño de filtros tolerantes a la aberración esférica .....	92
5.2. Estudio numérico de la sensibilidad a la aberración esférica del filtro SR.....	97
5.3. Verificación experimental del diseño realizado .....	101
5.3.1. Microscopía confocal de barrido .....	101
5.3.2. Descripción del montaje experimental .....	104
5.3.3. Resultados experimentales.....	110
5.3.4. Procedimiento híbrido para reducir el impacto de la aberración esférica.....	114
<b>6. Técnicas de conformado para incrementar la profundidad de campo .....</b>	<b>123</b>
6.1. Diseño de filtros para incrementar la profundidad de campo.....	124
6.2. Verificación experimental .....	127
6.2.1. Sistema formador de imágenes con apertura numérica baja .....	127
6.2.2. Microscopía convencional de barrido .....	132

<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>135</b>
<b>Anexo A: Algunas propiedades de la evolución de la varianza.....</b>	<b>139</b>
<b>Anexo B: Analogías con la Mecánica Cuántica .....</b>	<b>143</b>
<b>Anexo C: Forma alternativa de expresar el momento de se- gundo orden .....</b>	<b>145</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>147</b>

## Capítulo 1

### Introducción

#### 1.1. Motivaciones y objetivo general

La resolución espacial de los sistemas formadores de imágenes está limitada básicamente por la difracción, es decir, por su capacidad para generar un *spot* de focalización de dimensiones reducidas cuando forman la imagen de una fuente de luz puntual situada en el eje óptico. Desde la formulación de la teoría de ondas para los sistemas de microscopía [Abbe 1973], la mejora de la resolución de estos sistemas formadores de imágenes ha sido, durante las últimas décadas, objeto de numerosos estudios no sólo en frecuencias ópticas [Sales 1998], sino también en otros campos como la microscopía de rayos-X [Miao *et al.* 2002a] o la microscopía electrónica [Miao *et al.* 2002b].

A pesar de estas mejoras en la resolución espacial, el empleo de la microscopía convencional para la formación de imágenes de objetos tridimensionales (3D), tales como muestras médicas o biológicas, presenta un gran inconveniente: una imagen obtenida enfocando a una cierta profundi-

dad de la muestra contiene información desenfocada de todo el objeto. De esta forma, la relación señal-ruido de la imagen 3D resultante es muy baja. La solución a este problema se ha abordado desde diferentes perspectivas, entre ellas el incremento de la profundidad de campo del sistema, o la propuesta de nuevas arquitecturas en los sistemas de microscopía de barrido que otorguen al sistema una alta capacidad de seccionado óptico, como es el caso de la microscopía confocal.

En efecto, son numerosas las aplicaciones en las que la sensibilidad a pequeños desajustes entre la posición del plano objeto e imagen impone grandes limitaciones a los sistemas formadores de imágenes. Por ello, y con objeto de incrementar la profundidad de campo de estos sistemas, han sido muchos los estudios llevados a cabo en esta línea en los últimos años, obteniendo diferentes soluciones al problema mediante diversas técnicas de apodización [Chi y George 2001; Mino y Okano 1971; Ojeda-Castañeda *et al.* 1988; Welford 1960].

Por su parte, la microscopía confocal de barrido es capaz de seccionar ópticamente la imagen de un objeto 3D, gracias a su particular geometría. En estos sistemas, la luz monocromática procedente de una fuente puntual es focalizada sobre una pequeña región de la muestra 3D por medio de un objetivo de apertura numérica alta [Brakenhoff *et al.* 1979; McCutchen 1967; Minsky 1988; Sheppard y Choudhury 1977]. A continuación, la luz emitida por la muestra es colectada de nuevo por el mismo u otro objetivo, y, finalmente, es detectada mediante un detector puntual situado en el plano conjugado del foco. La imagen 3D se reconstruye por medio de un ordenador a partir de los valores de intensidad adquiridos tras realizar un

barrido 3D de la muestra [Brakenhoff *et al.* 1988; Pawley 1995]. La principal característica de estos sistemas es su increíble capacidad discriminadora con respecto a la distancia de focalización, debido a la habilidad que éstos poseen de rechazar la luz procedente de secciones del objeto que no están en foco.

No obstante, estos microscopios proporcionan una imagen 3D anisótropa que depende de la orientación de la muestra, debido a que la resolución axial es mucho peor que la transversal. Con objeto de mejorar la resolución axial de estos sistemas se han realizado diferentes propuestas, entre las que podemos destacar la microscopía confocal 4Pi [Blanca *et al.* 2001; Hell y Stelzer 1992], la microscopía confocal  $-\theta$  [Lindek *et al.* 1999; Stelzer y Lindek 1994] y la microscopía por inhibición de la emisión estimulada [Hell 2003; Klar *et al.* 2001].

A pesar de todo, un gran inconveniente de los sistemas confocales que trabajan con muestras fluorescentes es el blanqueo que sufre el colorante utilizado para producir la fluorescencia. Dicho blanqueo se ve acentuado en la microscopía confocal de barrido, ya que todo el volumen de la muestra que queda bajo el cono de iluminación es excitado cuando se forma la imagen de un único punto.

Tratando de salvar esta limitación se han propuesto diversas técnicas basadas en fenómenos no lineales, como por ejemplo la microscopía de barrido por excitación a dos fotones (TPE de la nomenclatura anglosajona *Two-Photon Excitation*). El principio básico de este fenómeno [Göppert-Mayer 1931] consiste en la excitación de una molécula mediante la absorción simultánea de dos fotones que proporcionan, en conjunto, la energía

necesaria para producir la transición al estado excitado, del que decae, posteriormente, emitiendo un único fotón por fluorescencia. Para que el rendimiento de estos sistemas sea alto se requiere una fuerte concentración espacial y temporal de la luz, lo que justifica el empleo de láseres de femtosegundos y objetivos de microscopio de gran apertura numérica en este campo de la microscopía. De particular interés es la microscopía por absorción a dos fotones de distinta energía, TCE (del inglés Two Color Excitation). En estos sistemas dos haces de iluminación de longitudes de onda diferentes, se superponen en el espacio y el tiempo para permitir la absorción simultánea de un fotón procedente de cada haz para producir la transición electrónica [Lim y Saloma 2002; Lindek y Stelzer 1999; Xiao *et al.* 2003].

Existen técnicas de conformado de la respuesta unidad mediante el empleo de filtros pupilares que, con una pequeña modificación de la arquitectura de los microscopios, son capaces de mejorar significativamente su rendimiento. Estas técnicas son además compatibles con cualquier geometría, como por ejemplo en el esquema confocal convencional [Boyer 2002; Boyer 2003; Ding *et al.* 1997; Juana *et al.* 2003a; Martínez-Corral *et al.* 1995; Martínez-Corral *et al.* 2002b; Neil *et al.* 2000; Sheppard 1999; Sherif y Török 2004], en alguna de sus variantes [Juana *et al.* 2003b; Martínez-Corral *et al.* 2002a, Martínez-Corral *et al.* 2003a] o en los sistemas de absorción de dos fotones [Blanca y Hell 2002; Ibáñez-López *et al.* 2004; Xiao *et al.* 2003].

Sin embargo, la calidad de la imagen proporcionada por dichos sistemas disminuye dramáticamente cuando algunas distorsiones de fase están

presentes en el proceso de formación de la misma. Muchas de estas aberraciones pueden ser compensadas mediante el empleo de sistemas ópticos de alta calidad pero, algunas de ellas no pueden ser corregidas fácilmente ya que están ligadas de manera inherente al proceso de barrido. En particular, la aberración esférica inducida por el grosor de la muestra y los cambios de índice de refracción de los medios atravesados por el haz de luz es de las más importantes a tener en cuenta [Sheppard 1988; Török *et al.* 1997]. Además de una absorción característica, un espécimen biológico puede presentar variaciones considerables en el índice de refracción [Bolin *et al.* 1989; Tearney *et al.* 1995]. Debido a que la profundidad de focalización, y con ello el espesor atravesado en el objeto, es variable durante el proceso de barrido, esta aberración no puede ser estáticamente compensada para todo el grosor de la muestra, a pesar de trabajar con elementos ópticos de muy alta calidad. Este tipo de distorsiones han estado sujetas a muchas investigaciones tanto en el campo de la biología, donde afectan considerablemente a la calidad de la imagen [Booth y Wilson 2000; Hell *et al.* 1993; Török *et al.* 1995a; Török *et al.* 1995b; Wilson y Carlini 1989], y a los niveles de señal y resolución en los microscopios confocales de barrido [Pawley 1995; Wilson y Sheppard 1984], como en multitud de dispositivos ópticos tales como el almacenamiento de datos ópticos [Day y Gu 1998], la lectura óptica de discos [Braat 1997; Stallinga 2005a; Stallinga 2005b] o los sistemas de confinamiento como las pinzas ópticas [Ke y Gu 1998; Reihani *et al.* 2006], entre otros.

La óptica adaptativa es una solución para evitar este efecto, ya que permite corregir dinámicamente la aberración esférica inducida por el grosor de la muestra [Booth *et al.* 2002; Somalinga *et al.* 2004; Theofanidou *et*

al. 2004]. Sin embargo, la implementación práctica de esta técnica no es una tarea fácil. Por ello, en la presente Memoria, hemos centrado nuestros esfuerzos en otra técnica, ligeramente menos eficiente pero de mayor simplicidad práctica. Nos referimos al diseño e implementación de nuevas familias de filtros pupilares con la habilidad de reducir las distorsiones de fase inducidas durante el proceso de barrido. El proceso de diseño de los filtros se ha basado en la búsqueda de elementos conformadores sencillos y de muy fácil fabricación. Para llevar a cabo esta tarea, el presente trabajo se ha estructurado en la forma que a continuación se detalla.

## **1.2. Esquema general**

Para comprender el funcionamiento de los sistemas formadores de imágenes así como la resolución de los mismos, es necesario realizar un estudio del fenómeno de difracción. Por ello, en el Capítulo 2 comenzamos describiendo las teorías de difracción necesarias para analizar los sistemas de microscopía que se tratarán a lo largo de este trabajo.

Teniendo en cuenta que la respuesta de los microscopios de barrido queda reducida al estudio de la respuesta unidad de un sistema focalizador, en el Capítulo 3 se llevará a cabo el estudio de esta respuesta así como el de la aberración esférica inducida en un sistema focalizador. Analizaremos tanto la aberración esférica inducida por las interfases de cambio de índice que atraviesa el haz cuando focaliza sobre la muestra como la aberración generada cuando el objetivo de microscopio trabaja con una longitud de tubo diferente de la de diseño.

El principal propósito de este trabajo es diseñar e implementar filtros pupilares que mejoren la tolerancia de los microscopios confocales de barrido frente a la aberración esférica. Para ello, en el Capítulo 4 desarrollaremos un formalismo matemático que nos permitirá llevar a cabo un estudio simple e intuitivo de dichos sistemas. De esta forma, seremos capaces, en el Capítulo 5, de minimizar el efecto de estas variaciones de fase mediante el empleo de una familia de filtros pupilares. Una vez propuesta esta familia de filtros, realizaremos un proceso de selección del filtro óptimo y presentaremos los resultados experimentales obtenidos al implementar el filtro seleccionado en un dispositivo real para la medida de la respuesta axial del sistema.

Por otro lado, los sistemas formadores de imágenes con mayor profundidad de campo son de gran interés en muchas aplicaciones, como ya hemos comentado anteriormente. En estos sistemas, cuando se forma la imagen de un plano intermedio de la muestra 3D, el efecto negativo provocado por los planos fuera de foco es menor que en los sistemas de microscopía convencional con una profundidad de campo reducida. A partir del estudio de la aberración esférica, en el Capítulo 6 seremos capaces de incrementar la profundidad de campo de un sistema de microscopía mediante el empleo de filtros de amplitud, lo que supone una pequeña modificación de la arquitectura del sistema. Finalmente, se presentarán dos experimentos con la finalidad de corroborar los resultados teóricos: uno de ellos en un sistema formador de imágenes de apertura numérica baja y el otro en un sistema de microscopía convencional.

Por último, en las conclusiones generales, expuestas en el Capítulo 7, se comentarán brevemente los logros alcanzados y se mencionarán las perspectivas de futuro que ofrece el trabajo.

## Capítulo 2

### Focalización de haces polarizados

El fenómeno de difracción interviene decisivamente en la capacidad de formación de imágenes de un sistema óptico, ya que cada punto luminoso del objeto, al proyectarse geoméricamente sobre su punto conjugado en el plano imagen, genera una mancha de difracción. En el caso en el que el sistema óptico es lineal, la imagen se construye a partir de la superposición de las manchas de difracción generadas por los diferentes puntos del objeto. Si además el sistema es invariante a desplazamientos proporciona las mismas respuestas para todos los puntos del objeto, aunque situadas en posiciones que dependen, en una relación de proporcionalidad, de las posiciones de los puntos del objeto. En este caso, el cálculo de la imagen es mucho más simple, y se obtiene a partir de la convolución entre la imagen geométrica y la mancha de difracción generada por un punto en eje. Esta última función se denomina respuesta unidad del sistema.

En este capítulo se pretende obtener una expresión matemática de la citada respuesta unidad, partiendo de la teoría clásica y atendiendo a las particularidades de los sistemas ópticos que se tratarán posteriormente.

## **2.1. Formación de imágenes 3D en sistemas telecéntricos**

Los sistemas de microscopía convencional son sistemas optimizados para proporcionar imágenes con alta resolución de objetos planos iluminados incoherentemente. Para estudiar su comportamiento cuando trabajan con objetos tridimensionales (3D), es decir, aquellos cuyo grosor es mayor que la profundidad de campo del sistema, es común asumir la aproximación de Born a primer orden [Born y Wolf 1999]. Por ello suponemos que los objetos 3D difractan débilmente, de forma que la luz difractada en cada sección transversal no es difractada nuevamente por planos posteriores del objeto. Bajo esta hipótesis, comenzaremos considerando un sistema formador de imágenes en la aproximación paraxial para terminar generalizando las expresiones a objetivos de microscopio de apertura numérica alta.

### **2.1.1. Aproximación paraxial**

Para tener una comprensión intuitiva de los principios de la microscopía óptica, es conveniente comenzar analizando la configuración representada en la Fig. 2.1, en la que hemos esquematizado un microscopio convencional mediante un acoplamiento telecéntrico<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Condición de telecentrismo: Cuando el diafragma de apertura de un sistema óptico se sitúa de forma que tanto la pupila de entrada como la de salida se encuentran en el infinito.

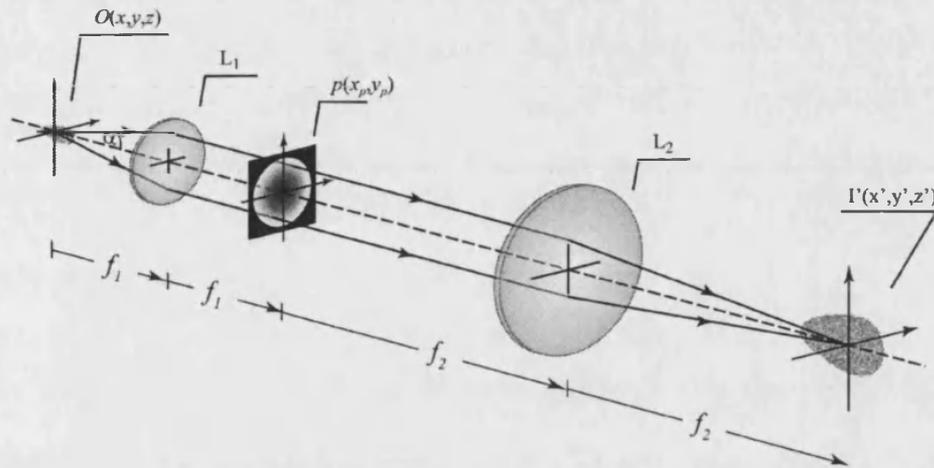


Fig. 2.1. Esquema de un sistema de microscopía convencional.

En este esquema hemos tenido en cuenta que en la actualidad muchos objetivos de microscopio se diseñan de forma que el plano objeto está conjugado con el infinito. En tal caso, la imagen intermedia se obtiene con la ayuda de una segunda lente, la lente de tubo<sup>2</sup>. El diafragma de apertura de este acoplamiento es precisamente el del objetivo, que está situado en el foco imagen del mismo. Es fácil comprobar que este acoplamiento telecéntrico constituye un sistema lineal e invariante a desplazamientos 3D (*Linear and Shift Invariant*, LSI, en la literatura anglosajona), por lo que queda completamente caracterizado por su respuesta unidad (PSF del inglés *Point Spread Function*), es decir, por la imagen proporcionada por un punto del objeto a través del sistema. Todo esto implica que la distribución de intensidades en el espacio imagen se obtiene mediante la convolución 3D de la imagen geométrica del objeto con la respuesta unidad del sistema

<sup>2</sup> Dependiendo del tipo de microscopio, esta imagen intermedia puede ser observada directamente a través de un ocular, o recogida con un sensor matricial (como una CCD o un CMOS) para su posterior procesado.

[Gu 1996]. En términos prácticos, consideremos una muestra 3D fluorescente que está iluminada uniformemente por un haz monocromático cuya longitud de onda coincide con la longitud de onda de excitación del colorante fluorescente. La distribución tridimensional de intensidad es proporcional a la función  $O(x, y, z)$ , que describe la distribución espacial de fluoroforos en la muestra. En este caso, la distribución de intensidades en el espacio imagen viene dada por la expresión

$$I'(x', y', z') = \frac{1}{M^2} O\left(\frac{x'}{M}, \frac{y'}{M}, \frac{z'}{M^2}\right) \otimes_3 |h'(x', y', z')|^2, \quad (2.1)$$

donde

$$h'(x', y', z') = i\lambda e^{ikz'} \iint P(x_p, y_p) \exp\left\{-i\frac{kz'}{2f_2^2}(x_p^2 + y_p^2)\right\} \times \exp\left\{-i\frac{2\pi}{\lambda f_2}(x_p x' + y_p y')\right\} dx_p dy_p \quad (2.2)$$

es la respuesta unidad en amplitudes del sistema y

$$M = -\frac{f_2}{f_1} \quad (2.3)$$

es el aumento lateral del sistema telecéntrico.

Naturalmente, un sistema no telecéntrico proporciona una señal de salida que, en sentido amplio, también puede llamarse imagen. Sin embargo, en este caso tanto el aumento lateral como la respuesta unidad dependen

de  $z$ . Este tipo de dispositivos proporcionan imágenes de calidad heterogénea y no puede aplicárseles procedimientos de desconvolución [Shaevitz y Fletcher 2007].

El proceso de formación de imágenes en sistemas LSI 3D, puede interpretarse como un proceso híbrido en el que se pueden diferenciar los efectos difractivos de los de formación de imágenes en términos de la óptica geométrica. De esta forma, podemos entender que la imagen final no es más que una versión escalada (esto es, la imagen geométrica) de una distribución objeto virtual de irradiancia [Zapata-Rodríguez 1999],  $I_v(x, y, z)$ , donde hemos incluido los efectos de la difracción, es decir,

$$I'(x, y, z) = \frac{1}{M^2} I_v\left(\frac{x}{M}, \frac{y}{M}, \frac{z}{M^2}\right), \quad (2.4)$$

o equivalentemente

$$I_v(x, y, z) = M^2 I'(Mx, My, M^2 z). \quad (2.5)$$

A partir de la Ec. (2.1) podemos escribir

$$I_v(x, y, z) = O(x, y, z) \otimes_3 |h(x, y, z)|^2, \quad (2.6)$$

donde

$$h(x, y, z) = i\lambda e^{ikz} \iint p(x_p, y_p) \exp\left\{-i\frac{kz}{2f_1^2}(x_p^2 + y_p^2)\right\} \times \exp\left\{-i\frac{2\pi}{\lambda f_1}(x_p x + y_p y)\right\} dx_p dy_p \quad (2.7)$$

es la respuesta unidad del sistema expresada ahora en el espacio objeto.

Tal y como hemos visto, la capacidad de formación de imágenes de un sistema telecéntrico queda plenamente caracterizada a través de su respuesta unidad  $|h'(x', y', z')|^2$  o, equivalentemente, de su análoga virtual del espacio objeto  $|h(x, y, z)|^2$ . Por tanto, para caracterizar estos sistemas basta con calcular la distribución de intensidades que se obtiene al iluminar la pupila  $p(x_p, y_p)$  con una onda plana monocromática en eje. Es decir, podemos reducir nuestro análisis al estudio de lo que denominaremos como respuesta unidad de un sistema focalizador.

### 2.1.2. Objetivos de apertura numérica alta

La calidad de la imagen óptica es tanto mejor cuanto más confinada esté la respuesta unidad. Dado que la respuesta unidad 3D está constituida por la transformada de Fourier de la función pupila y sus patrones desenfocados, cuanto mayor sea el tamaño angular de la pupila, mayor será el confinamiento de la respuesta unidad. Sin embargo, en los objetivos de apertura numérica alta donde la focalización se produce con gran divergencia angular no pueden ser representados fielmente por ecuaciones desarrolladas en el marco de la teoría paraxial.

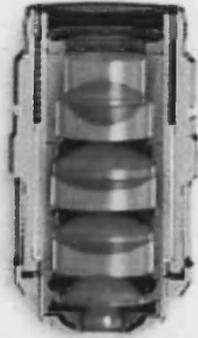


Fig. 2.2. Esquema de un objetivo de microscopio.

Para analizar la formación de imágenes con un sistema telecéntrico similar al mostrado en la Fig. 2.1, pero en el que la lente  $L_1$  es sustituida por un elemento focalizador de estructura mucho más compleja (ver por ejemplo Fig. 2.2), basta con calcular de nuevo la respuesta unidad del elemento focalizador. Para abordar este problema, tendremos en cuenta que estos elementos se pueden representar, no por unos planos principales como en óptica paraxial, sino a través de sus superficies principales. Tal y como se muestra en la Fig. 2.3, las superficies principales son una superficie plana y una superficie esférica centrada en  $F$ <sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> Al igual que en el caso paraxial, un rayo que incide paralelo al eje óptico a una cierta altura de  $S_2$ , aparece en  $S_1$  a la misma altura, pero dirigiéndose al foco  $F$ .

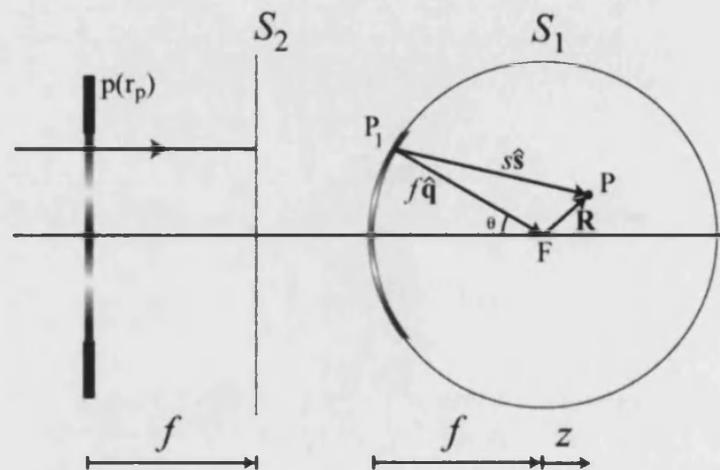


Fig. 2.3. Esquema de focalización para un objetivo de apertura numérica alta.

Los objetivos se diseñan de tal forma que el diafragma de apertura se encuentra en el plano focal objeto del mismo. En la figura anterior hemos representado, siguiendo un razonamiento parageométrico, la trayectoria de un rayo normal al frente de ondas. Esta forma de razonar permite comprender fácilmente que el diafragma de apertura se proyecta sobre  $S_1$  y que, por tanto, a la salida del objetivo se tiene un frente de ondas esférico truncado. Esta proyección puede analizarse de diferentes formas dependiendo de las condiciones que determinan la inclinación de los rayos en el sistema [Sheppard y Gu 1993]. Los dos casos más comunes son los sistemas diseñados para cumplir la condición del seno o los sistemas que satisfacen la condición de Herschel.

## 2.2. Teoría escalar de Debye

Para calcular la distribución de amplitudes en los alrededores del foco, es necesario integrar las contribuciones de los diferentes puntos del frente

de ondas esférico. Para ello hacemos uso de la primera ecuación de Rayleigh-Sommerfeld [Stamnes 1986], que permite reconstruir el campo en las proximidades del foco, mediante la superposición de las ondas esféricas secundarias originadas en cada punto del frente de ondas esférico, es decir

$$h(P) = \frac{-i}{\lambda} \iint_{S_1} U(P_1) \frac{\exp(iks)}{s} d^2S. \quad (2.8)$$

En la geometría bajo estudio (ver Fig. 2.3),  $\hat{\mathbf{q}}$  y  $\hat{\mathbf{s}}$  son, respectivamente, los vectores unitarios desde un punto,  $P_1$ , del frente de ondas emergente, al punto focal,  $F$ , y a un punto arbitrario  $P$  perteneciente al volumen focal. La distribución de amplitudes de las ondas esféricas secundarias viene dada por

$$U(P_1) = P(P_1) \frac{\exp(-ikf)}{f}, \quad (2.9)$$

siendo  $P(P_1)$  la función que determina la forma de la apertura. Asumiendo que la distancia  $R$  es mucho menor que la distancia focal, es decir, que puede despreciarse la inclinación entre los vectores unitarios  $\hat{\mathbf{s}}$  y  $\hat{\mathbf{q}}$ , podemos aproximar

$$\hat{\mathbf{q}} \cdot \mathbf{R} \approx s - f \quad \text{y} \quad d^2S \approx f^2 d^2\Omega, \quad (2.10)$$

donde  $d^2\Omega$  es el ángulo sólido subtendido por un elemento de superficie  $d^2S$  del frente de ondas esférico sobre el punto focal  $F$ . De esta manera, la Ec. (2.8) puede escribirse de la forma

$$h(\mathbf{R}) = \frac{-i}{\lambda} \iint_{\Omega} P(\hat{\mathbf{q}}) \exp(ik\hat{\mathbf{q}} \cdot \mathbf{R}) d^2\Omega. \quad (2.11)$$

Esta ecuación, conocida como la representación integral de Debye para campos fuertemente focalizados [Debye 1909], permite obtener el campo como una superposición coherente de ondas planas y monocromáticas. Las direcciones de propagación de dichas ondas (especificadas por los vectores  $\hat{\mathbf{q}}$ ) pertenecen al cono geométrico definido por el foco y la proyección de la función pupila sobre la superficie esférica principal [Gu 2000].

Como en la mayoría de objetivos la transmitancia en amplitud del diafragma de apertura presenta simetría de revolución, resulta conveniente expresar las posiciones en la esfera de referencias en coordenadas esféricas. Así, situando el origen en el foco  $F$  tenemos

$$\hat{\mathbf{q}} = (-\sin\theta \cos\phi, -\sin\theta \sin\phi, \cos\theta), \quad (2.12)$$

y

$$d^2\Omega = \sin\theta d\theta d\phi. \quad (2.13)$$

Del mismo modo, la posición de  $P$  se puede expresar en coordenadas cilíndricas centradas de nuevo en el foco,

$$\mathbf{R} = (r \cos\psi, r \sin\psi, z). \quad (2.14)$$

Así, la distribución de amplitudes en la región focal se puede expresar como

$$h(r, \psi, z) = \frac{-i}{\lambda} \int_0^{2\pi} \int_0^\alpha P(\theta, \phi) \exp\{-ikr \sin \theta \cos(\phi - \psi)\} \times \exp(ikz \cos \theta) \sin \theta d\theta d\phi, \quad (2.15)$$

donde  $\alpha$  es el valor máximo del ángulo de apertura  $\theta$ .

En el caso en que la función pupila tenga simetría de revolución en torno al eje  $z$ , podemos escribir

$$h(r, z) = -i \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^\alpha P(\theta) \exp(ikz \cos \theta) J_0(kr \sin \theta) \sin \theta d\theta. \quad (2.16)$$

Esta distribución suele expresarse en términos de las siguientes coordenadas adimensionales<sup>4</sup>

$$r_N = \frac{n}{\lambda} r \sin \alpha, \quad z_N = \frac{2n}{\lambda} z \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right), \quad (2.17)$$

con lo cual

$$h(r_N, z_N) = -i \frac{2\pi}{\lambda} \exp\left[\frac{i\pi z_N}{\sin^2(\alpha/2)}\right] \int_0^\alpha P(\theta) \exp\left(-i2\pi z_N \frac{\sin^2(\theta/2)}{\sin^2(\alpha/2)}\right) \times J_0\left(2\pi r_N \frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right) \sin \theta d\theta. \quad (2.18)$$

<sup>4</sup> Esta normalización cobra sentido cuando se analiza en el dominio frecuencial, ya que normaliza a la unidad el radio de la esfera de referencia.

### 2.3. Teoría vectorial de Debye

Las limitaciones de la teoría escalar aparecen cuando los sistemas formadores de imágenes trabajan con una apertura numérica alta y cuando las características relacionadas con el estado de polarización de la luz no pueden ser ignoradas. En estos casos resulta necesaria una teoría vectorial [Martínez-Herrero *et al.* 2001].

#### 2.3.1. Matrices de Jones generalizadas

En este apartado nos basamos de nuevo en un razonamiento para-geométrico de forma que analizamos, mediante un formalismo generalizado de matrices de Jones, la propagación de rayos de luz polarizados. Esta forma de razonar permite especificar el valor del campo eléctrico en la superficie principal esférica. La idea del trazado de rayos vectorial fue asumida y empleada hace mucho tiempo [Richards y Wolf 1959]. No obstante, la posibilidad de escribir este problema en términos matriciales es algo más reciente y fue llevada a cabo por Török *et al.* [Török *et al.* 1995a; Török y Wilson 1997; Török 2003].

El formalismo matricial de Jones [Azzam y Bashara 1992] es fácil de aplicar para describir la evolución del estado de polarización del campo luminoso a través de un sistema óptico. No obstante, este formalismo no es capaz de describir campos no colimados debido a que las matrices de Jones son matrices de dimensión  $2 \times 2$ . El formalismo que se describe a continuación se basa en matrices de dimensión  $3 \times 3$ , por lo que permite describir también los campos no colimados.

Para desarrollar este formalismo debemos tener en cuenta, en primer lugar, que cuando una onda plana polarizada es refractada en la superficie que separa dos medios dieléctricos homogéneos e isótropos de índice de refracción diferentes, la componente del vector campo eléctrico perpendicular a la sección meridional<sup>5</sup> (componente  $s$ ) no cambia, mientras que la componente paralela (componente  $p$ ) sufre cambios de dirección. Estos cambios los describiremos mediante la matriz

$$P = \begin{pmatrix} \cos \theta & 0 & \sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta & 0 & \cos \theta \end{pmatrix} \quad (2.19)$$

donde  $\theta = \theta_t - \theta_i$  (ver Fig. 2.4).

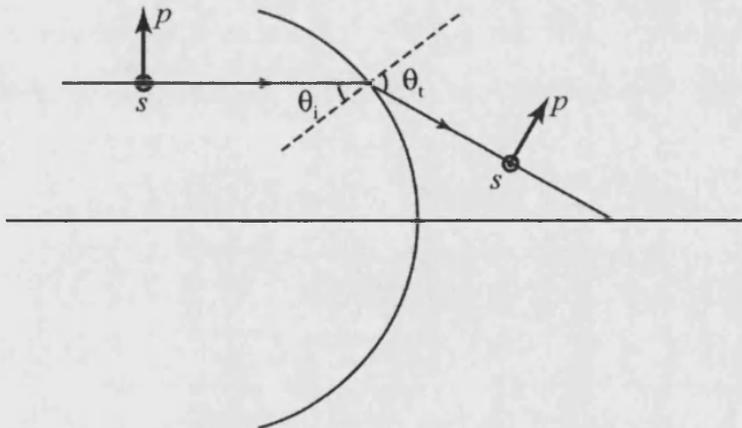


Fig. 2.4. En la refracción las componentes del campo eléctrico sufren cambios tanto en su amplitud como en su dirección.

<sup>5</sup> Se define la sección meridional como aquella que contiene al rayo y al eje óptico.

Además, la amplitud de ambas componentes se ve afectada por los coeficientes de Fresnel [Hecht 2000]. Este cambio se describe mediante la matriz

$$\mathbb{I}_i = \begin{pmatrix} t_p & 0 & 0 \\ 0 & t_s & 0 \\ 0 & 0 & t_p \end{pmatrix}, \quad (2.20)$$

donde

$$t_p = \frac{2 \sin \theta_i \cos \theta_i}{\sin(\theta_i + \theta_t) \cos(\theta_i - \theta_t)} \quad \text{y} \quad t_s = \frac{2 \sin \theta_i \cos \theta_i}{\sin(\theta_i + \theta_t)} \quad (2.21)$$

Por último, cuando el campo eléctrico está expresado en un sistema cartesiano que difiere del constituido por la sección meridional y su perpendicular, es necesario aplicar una rotación alrededor del eje  $z$  que permita expresar el campo en sus componentes  $s$  y  $p$ . Para ello se utiliza la matriz

$$\mathbb{R} = \begin{pmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}. \quad (2.22)$$

### 2.3.2. Integral de Debye-Wolf

Cuando una onda plana polarizada incide sobre un sistema focalizador de apertura numérica alta, sufre una fuerte refracción. Como consecuencia

de ella, aparecen otras componentes cartesianas en el vector de polarización (Fig. 2.5).

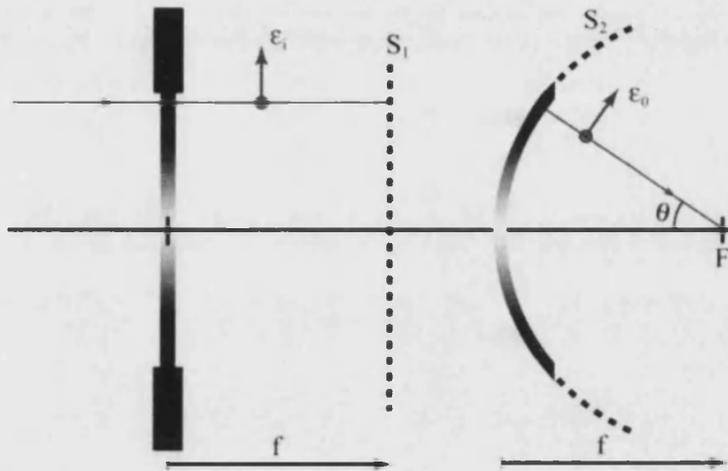


Fig. 2.5. Efecto de la refracción en la polarización de la luz, con una onda linealmente polarizada.

La integral de Debye obtenida en la Ec. (2.15) puede escribirse como

$$\mathbf{E}(r, \psi, z) = \frac{-i}{\lambda} \int_0^{2\pi} \int_0^\alpha \boldsymbol{\epsilon}_0(\theta, \phi) \exp[-ikr \sin \theta \cos(\phi - \psi)] \times \quad (2.23)$$

$$\times \exp(ikz \cos \theta) \sin \theta \, d\theta \, d\phi,$$

donde, dado que ahora tenemos en cuenta los efectos de polarización,  $\mathbf{E}(r, \psi, z)$  es el campo eléctrico en un punto de la región focal y  $\boldsymbol{\epsilon}_0(\theta, \phi)$  es el vector eléctrico sobre un punto de la superficie esférica de referencia, el cual puede obtenerse a partir del formalismo de las matrices de Jones generalizadas descrito previamente.

Consideremos, en nuestro razonamiento parageométrico, un rayo que incide paralelo al eje óptico y cuyo estado de polarización es

$\boldsymbol{\varepsilon}_i = (\varepsilon_x, \varepsilon_y, 0)$ . Para poder aplicar los efectos de la refracción es necesario primero aplicar la rotación que permita expresarlo en sus componentes  $s$  y  $p$ . Aplicando a continuación los efectos de la refracción obtenemos que el vector campo eléctrico sobre la esfera de referencia vale

$$\boldsymbol{\varepsilon}_r = I_t P R \boldsymbol{\varepsilon}_i. \quad (2.24)$$

Naturalmente, este vector necesita volver a ser transformado para expresarlo de nuevo en términos del sistema cartesiano original; es decir,

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\varepsilon}_0 &= R^{-1} I_t P R \boldsymbol{\varepsilon}_i = \\ &= \frac{1}{2} \begin{pmatrix} \varepsilon_x [(t_p \cos \theta + t_s) + (t_p \cos \theta - t_s) \cos 2\phi] + \varepsilon_y (t_p \cos \theta - t_s) \sin 2\phi \\ \varepsilon_y [(t_p \cos \theta + t_s) - (t_p \cos \theta - t_s) \cos 2\phi] + \varepsilon_x (t_p \cos \theta - t_s) \sin 2\phi \\ -2t_p \sin \theta (\varepsilon_x \cos \phi + \varepsilon_y \sin \phi) \end{pmatrix}. \end{aligned} \quad (2.25)$$

Este formalismo permite analizar el volumen focal obtenido al focalizar una onda plana con polarización arbitraria. A continuación, vamos a particularizarlo a un caso sencillo pero de gran interés práctico. Nos referimos al caso en que el haz incidente está polarizado linealmente. Si consideramos además que en primera aproximación  $t_s = t_p = 1$ , obtenemos

$$\boldsymbol{\varepsilon}_0 = \frac{P(\theta)}{2} \begin{pmatrix} (\cos \theta + 1) + (\cos \theta - 1) \cos 2\phi \\ (\cos \theta - 1) \sin 2\phi \\ -2 \sin \theta \cos \phi \end{pmatrix}, \quad (2.26)$$

donde hemos considerado, sin que ello implique pérdida de generalidad, que el campo incidente está polarizado en la dirección  $x$ , es decir,  $\boldsymbol{\varepsilon}_i = (\rho, 0, 0)$ .

Así, sustituyendo la Ec. (2.26) en la Ec. (2.23), y haciendo uso de las identidades [Watson 1995],

$$\int_0^{2\pi} \cos(n\alpha) \exp[ia \cos(\alpha - \beta)] d\alpha = 2\pi i^n \cos(n\beta) J_n(a), \quad (2.27)$$

$$\int_0^{2\pi} \sin(n\alpha) \exp[ia \cos(\alpha - \beta)] d\alpha = 2\pi i^n \sin(n\beta) J_n(a), \quad (2.28)$$

donde  $n$  es un número entero y  $J_n$  es la función de Bessel de primera clase y orden  $n$ , obtenemos

$$\mathbf{E}(r, z; \psi) = \frac{-i\pi}{\lambda} \{ (I_0 + I_2 \cos 2\psi) \mathbf{i} + I_2 \sin 2\psi \mathbf{j} - 2iI_1 \cos \psi \mathbf{k} \}. \quad (2.29)$$

En esta expresión, las funciones  $I_0$ ,  $I_1$  e  $I_2$  vienen dadas por

$$I_0 = \int_0^\alpha P(\theta) (1 + \cos \theta) J_0(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) \sin \theta d\theta, \quad (2.30)$$

$$I_1 = \int_0^\alpha P(\theta) \sin \theta J_1(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) \sin \theta d\theta, \quad (2.31)$$

$$I_2 = \int_0^\alpha P(\theta) (1 - \cos \theta) J_2(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) \sin \theta d\theta, \quad (2.32)$$



y son conocidas como relaciones o integrales de Richards y Wolf [Richards y Wolf 1959].

Tradicionalmente la función que se emplea para caracterizar la transmisión de la luz a través del sistema óptico no es la función de apodización,  $P(\theta)$ , definida sobre la esfera de referencia. Se suele usar, en cambio, la transmitancia de la pupila del sistema,  $p(\rho)$ , en términos de la coordenada radial normalizada  $\rho = r_p / r_{\max}$  sobre el plano de la pupila, siendo  $r_{\max}$  la extensión radial máxima de la misma. Como ya se ha comentado anteriormente, los dos casos más comunes son los sistemas diseñados para cumplir la condición del seno o los sistemas que satisfacen la condición de Herschel. En el primero de los casos, la ley de transferencia desde el plano de la pupila hasta la función de apodización viene dada por

$$\begin{cases} \rho = \frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \\ P^{(S)}(\theta) = p(\rho) \sqrt{\cos \theta}, \end{cases} \quad (2.33)$$

mientras que para los sistemas que cumplen la condición de Herschel se tiene

$$\begin{cases} \rho = \frac{\sin(\theta/2)}{\sin(\alpha/2)} \\ P^{(H)}(\theta) = p(\rho). \end{cases} \quad (2.34)$$

#### 2.4. El fenómeno de despolarización

Cuando un campo de luz colimado y linealmente polarizado es focalizado a través de un objetivo de apertura numérica alta, se generan componentes perpendiculares a la polarización inicial. Debido a la dependencia con el ángulo  $\psi$  estas componentes no tienen simetría de revolución [Dorn *et al.* 2003]. Para ilustrar la importancia del fenómeno, conocido como despolarización, en la Fig. 2.6 hemos representado la distribución de irradiancia normalizada en el volumen focal correspondiente a las componentes de polarización. Para el cálculo hemos considerado dos objetivos de apertura numérica baja y alta ( $AN = 0.3$  y  $1.2$ ). Para cada componente de polarización hemos seleccionado el plano meridional para el cual su amplitud es máxima.

Nótese que cuando la apertura numérica es alta, la componente  $E_z$  es significativa. En cambio, para aperturas numéricas bajas, los valores máximos de las componentes  $E_y$  y  $E_z$  no superan el 1% y se puede describir el proceso de focalización sin tener en cuenta el estado de polarización del haz incidente.

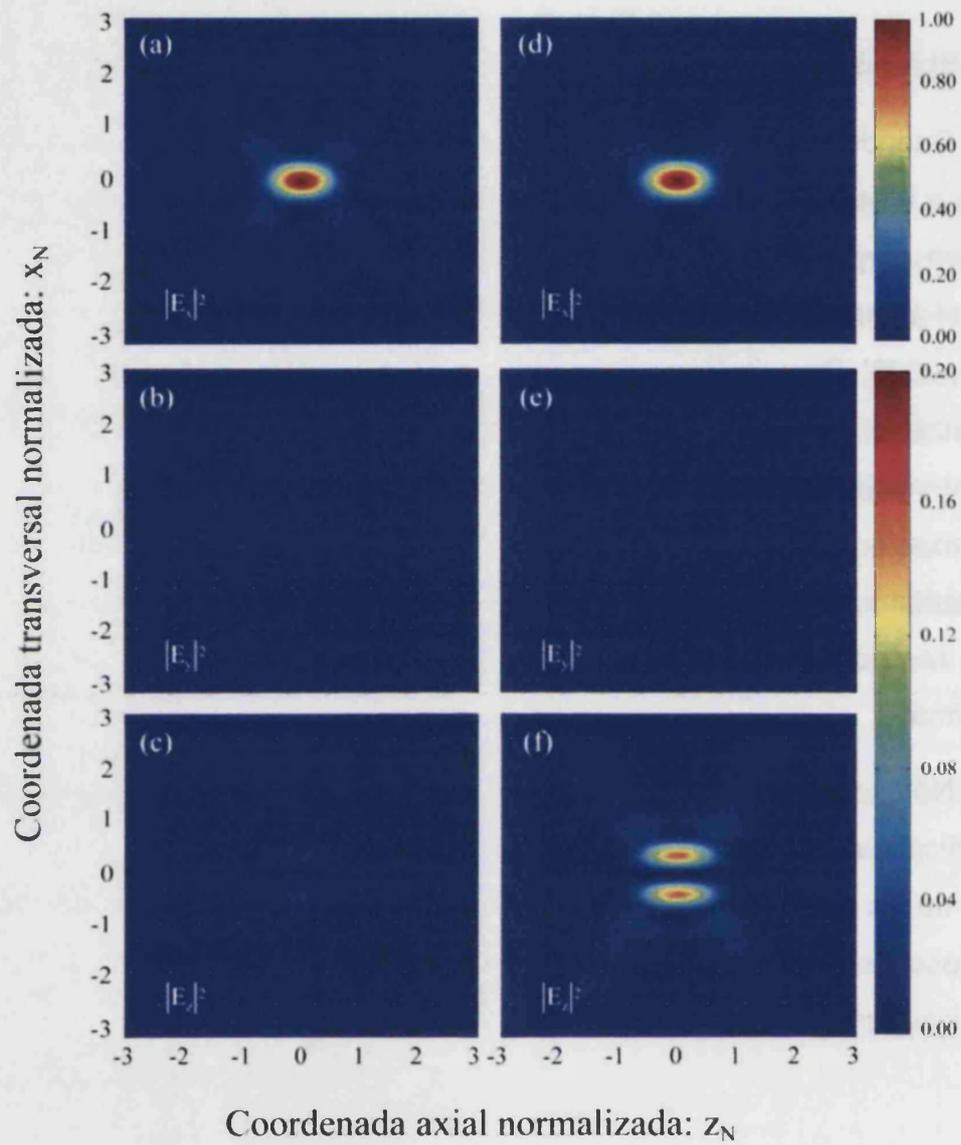


Fig. 2.6. Efecto de despolarización sobre una onda linealmente polarizada en la dirección  $x$ . (a), (b) y (c) Componentes  $|E_x(r, z; \psi = 0)|^2$ ,  $|E_y(r, z; \psi = \pi/4)|^2$ ,  $|E_z(r, z; \psi = 0)|^2$  a través de un objetivo de  $AN = 0.30$ . (d), (e) y (f) Ídem para un objetivo de  $AN = 1.20$ .

Este fenómeno de despolarización es mucho más intenso cuando se hace uso de diafragmas de apertura en forma de corona circular [Bahlmann y Hell 2000; Chon *et al.* 2002; Dorn *et al.* 2003; Ganic *et al.* 2003]. Estas aperturas, comúnmente llamadas *pupilas anulares*, se suelen usar en un contexto escalar para aumentar la resolución transversal del sistema [Blanca *et al.* 2001; Gu *et al.* 1994; Martínez-Corral *et al.* 2002b]. Sin embargo, cuando se ilumina el objetivo con un haz polarizado, estas aperturas dejan pasar sólo los rayos más exteriores que son, precisamente, los más propensos a la despolarización. Este resultado ha permitido asentar la idea de que los filtros anulares no son útiles bajo iluminación polarizada. Sin embargo, nosotros hemos demostrado que es posible diseñar una familia de filtros anulares, conocidos como *filtros de tres anillos* (3R, de la nomenclatura anglosajona *three rings filters*), que permiten aumentar el confinamiento de la respuesta unidad [Martínez-Corral *et al.* 2003b], sin que ello conlleve un incremento de despolarización [Martínez-Corral *et al.* 2004].

En la Fig. 2.7 mostramos la forma de un elemento de esta familia de filtros. El círculo interior y la corona más externa tienen la misma área. Para entender mejor el comportamiento axial de estos filtros podemos recurrir a la analogía con la experiencia de Young. La zona central y la corona exterior generan un patrón interferencial en el que el estrechamiento del lóbulo central y la altura de los laterales aumentan a medida que el área de dichas zonas disminuye. El anillo intermedio proporciona una distribución de intensidades en forma de seno cociente, que contribuirá, principalmente, a resaltar el lóbulo central de la distribución anterior. La suma de ambos efectos da lugar a un patrón axial donde se puede conseguir un estrechamiento del lóbulo central, respecto al patrón generado por la pupila circular, y donde,

además, la altura de éste esté fuertemente resaltada respecto a la de los laterales.



Fig. 2.7. Filtro 3R con los siguientes radios para los anillos:  $r_1 = 0.61$ ,  $r_2 = 0.73$ ,  $r_3 = 0.81$ ,  $r_4 = 0.89$  y  $r_5 = 1.0$ .

Además, estos filtros tienen la habilidad de no provocar un aumento de la despolarización, ya que la despolarización debida al anillo más exterior es compensada por la parte del frente de ondas que incide sobre la zona central del filtro.

Para demostrar la utilidad de estos filtros, en la Fig. 2.8 se han repetido los mismos cálculos mostrados en la Fig. 2.6, para el objetivo de apertura numérica alta, pero donde ahora la pupila circular se ha sustituido por el filtro 3R mostrado en la Fig. 2.7.

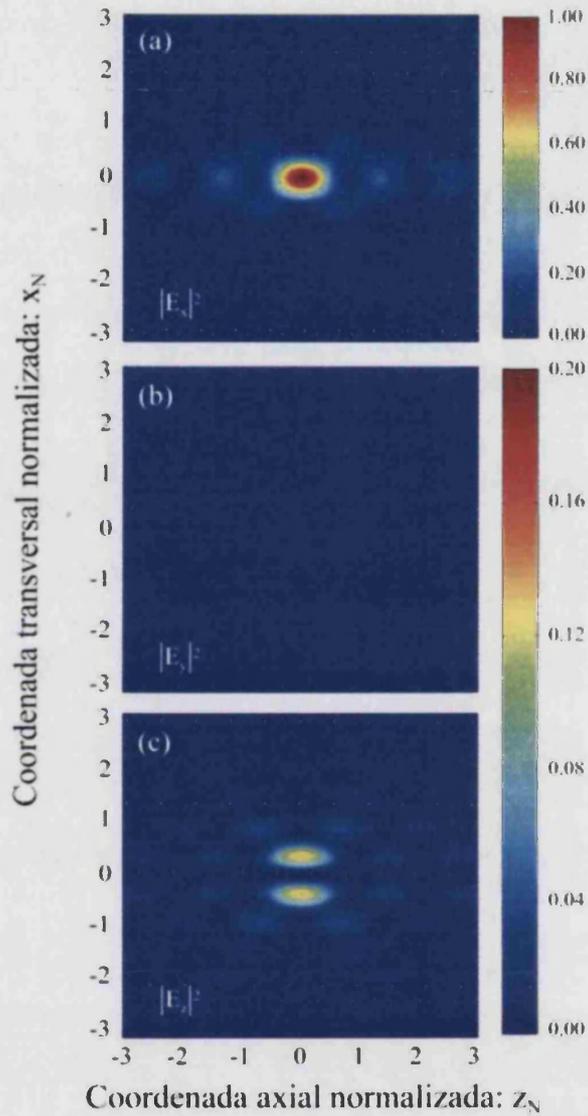


Fig. 2.8. Distribución de irradiancia normalizada en la región focal de un objetivo con  $AN = 1.2$  en agua para el filtro 3R, cuando el haz incidente es plano, monocromático y linealmente polarizado en la dirección  $x$ : (a)  $|E_x(r_2, z_2; \psi = 0)|^2$ , (b)  $|E_y(r_2, z_2; \psi = \pi/4)|^2$ , (c)  $|E_z(r_2, z_2; \psi = 0)|^2$ .

La luz a la salida del filtro 3R es del 70.3%. Nótese, a partir de la Fig. 2.8, que el uso del filtro 3R produce una reducción del 14% de la anchura axial en el lóbulo central de la distribución de intensidad focal. Además, los picos de intensidad para las componentes polarizadas en la dirección  $y$  y  $z$  son inferiores a los producidos en el caso análogo con la pupila circular, es decir, el uso del filtro 3R propuesto disminuye ligeramente el efecto de despolarización.

En definitiva, los filtros de tres anillos pueden emplearse efectivamente para mejorar la resolución axial en los sistemas formadores de imágenes.

## Capítulo 3

### Efecto de la aberración esférica en sistemas con apertura numérica alta

Uno de los objetivos de la bio-fotónica es el desarrollo de dispositivos que permitan obtener, por medios no invasivos, imágenes de alta resolución y contraste de micro/nano organismos como bacterias, virus y otros marcadores biológicos. Para la obtención de estas imágenes se suelen utilizar diversos tipos de microscopios de barrido. Estos sistemas proporcionan imágenes 3D de alto contraste debido a las ventajas de utilizar una iluminación altamente inhomogénea, obtenida al concentrar sobre el punto de muestreo la luz monocromática focalizada por un objetivo de microscopio de apertura numérica alta. Nótese que en estos dispositivos la muestra biológica suele estar sumergida en un líquido cuyo índice de refracción es próximo al de la muestra, pero muy diferente al del líquido de inmersión. Por ello, el estudio de un sistema que focaliza a través de un medio estratificado con distintos índices de refracción es de especial interés.

En este proceso de focalización se produce una fuerte distorsión del frente de ondas, originalmente esférico. La magnitud de esta distorsión depende de la profundidad de la focalización, de la apertura numérica del

objetivo focalizador y de los índices de refracción que separan las interfaces. Es de gran interés práctico estudiar la posibilidad de corregir dichas aberraciones ya que pueden afectar fuertemente a la calidad de la imagen en sistemas de microscopía.

A lo largo del capítulo veremos que cuando un sistema de apertura numérica alta focaliza a través de una o varias interfases perpendiculares al eje óptico, la aberración resultante es exclusivamente esférica al igual que en el caso donde el objetivo trabaja con una longitud de tubo que no es la de diseño [Sheppard y Cogswell 1991; Török *et al.* 1995a]. Una vez obtenida una expresión analítica para dicha función de aberración, realizamos algunos desarrollos matemáticos que facilitan el estudio del comportamiento axial. Finalmente, analizamos el efecto de la inserción de determinados elementos conformadores en el diafragma de apertura del sistema.

Cabe señalar que en este estudio, no tendremos en cuenta el carácter vectorial del campo. Esta suposición es correcta para ángulos de convergencia inferiores a  $45^\circ$  [Wilson y Sheppard 1984]. No obstante, incluso para un objetivo de microscopio de  $AN = 1.4$ , los efectos vectoriales no alteran apreciablemente la forma de la distribución tridimensional del campo luminoso [Day y Gu 1998].

### **3.1. Aberración introducida por un medio estratificado**

Consideremos la situación general que se muestra en la Fig. 3.1, en la que la onda esférica que emerge de un objetivo de microscopio focaliza a través de un medio de índice de refracción estratificado. Las interfases del medio estratificado son normales al eje óptico, están situadas en los planos

$z = -d_1, -d_2, \dots, -d_{N-1}$  y separan regiones dieléctricas con índices de refracción  $n_1, n_2, \dots, n_N$ , respectivamente.

En los próximos apartados deduciremos la expresión de la aberración esférica inducida al focalizar en un medio estratificado con una, dos o  $N$  interfases.

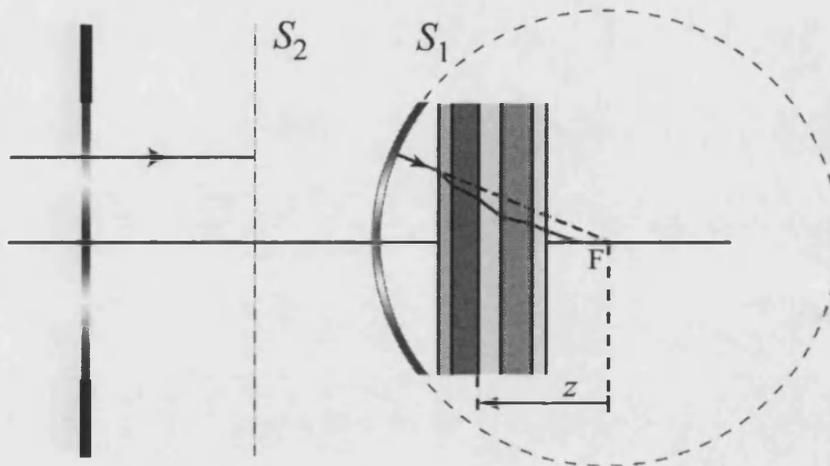


Fig. 3.1. Esquema de focalización de la luz a través de un medio estratificado.

### 3.1.1. Medio con una interfase

Para evaluar las distorsiones de fase hacemos uso de la interpretación de Debye, que reconstruye el campo en el volumen focal como una superposición de ondas planas. Cada una de estas ondas planas se refracta en la interfase obedeciendo la ley de Snell  $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$ . El campo resultante se reconstruye mediante la superposición de las ondas planas refractadas. En la Fig. 3.2 hemos representado una de las ondas planas mediante el rayo normal al frente de ondas.

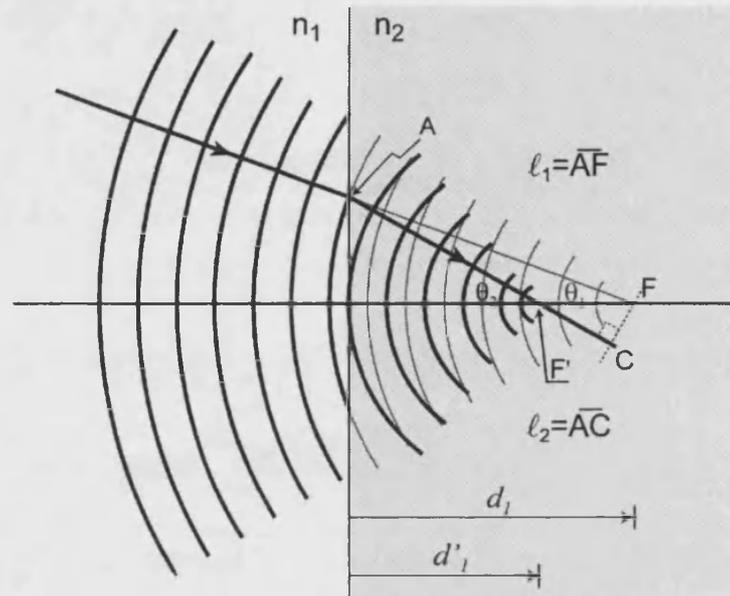


Fig. 3.2. Geometría focalizadora para una interfase.

El retardo de fase sufrido por este rayo arbitrario es proporcional a la diferencia de camino óptico [Booth *et al.* 1998]

$$W(\theta_1) = \frac{1}{\lambda} [n_2 l_2(\theta_1) - n_1 l_1(\theta_1)]. \quad (3.1)$$

Teniendo en cuenta las relaciones trigonométricas entre los ángulos involucrados en la focalización, podemos reescribir la expresión anterior expresando dichas longitudes en términos de las cantidades angulares correspondientes, de tal forma que

$$\begin{aligned} W(\theta_1; d_1) &= \frac{1}{\lambda} \left( n_2 \frac{d_1 \cos(\theta_2 - \theta_1)}{\cos \theta_1} - n_1 \frac{d_1}{\cos \theta_1} \right) = \\ &= \frac{1}{\lambda} d_1 \left( n_2 \cos \theta_2 + \frac{n_2 \sin \theta_1 \sin \theta_2 - n_1}{\cos \theta_1} \right). \end{aligned} \quad (3.2)$$

Finalmente, teniendo en cuenta la ley de Snell obtenemos

$$W(\theta_1; d_1) = \frac{1}{\lambda} d_1 (n_2 \cos \theta_2 - n_1 \cos \theta_1). \quad (3.3)$$

Como la función de aberración depende únicamente de la coordenada axial  $d_1$  y del ángulo  $\theta_1$ , está claro que describe una aberración esférica.

### 3.1.2. Medio con dos interfases

Abordemos ahora el caso en que el frente de ondas emergente del objetivo focaliza a través de dos interfases que separan tres medios homogéneos de índice de refracción diferente. El esquema de esta situación particular se muestra en la Fig. 3.3.

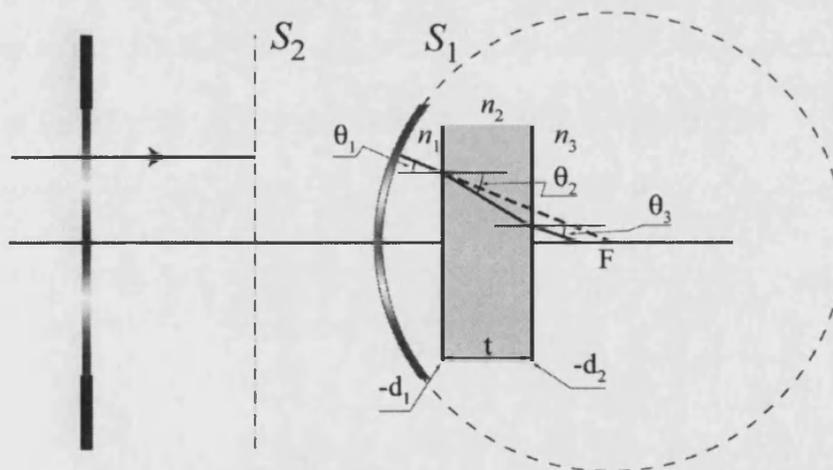


Fig. 3.3. Geometría focalizadora para dos interfases.

En este caso, puede demostrarse que la aberración total se halla realizando la suma de la aberración introducida por cada una de las interfases. Por tanto, tenemos

$$W(\theta_1; d_1, d_2) = \frac{1}{\lambda} \times \quad (3.4)$$

$$\times [d_1 (n_2 \cos \theta_2 - n_1 \cos \theta_1) + d_2 (n_3 \cos \theta_3 - n_2 \cos \theta_2)].$$

El caso en que  $n_3 = n_1$  corresponde a la aberración esférica introducida por una lámina dieléctrica, de espesor  $t$  e índice de refracción  $n_2$ , inmersa en un medio de índice  $n_1$ . A partir de la Ec. (3.4) obtenemos

$$W(\theta_1; t) = \frac{1}{\lambda} t (n_2 \cos \theta_2 - n_1 \cos \theta_1), \quad (3.5)$$

donde  $t = d_1 - d_2$ . Esta ecuación es similar a la Ec. (3.3) y por tanto corresponde también a una aberración esférica. La diferencia entre ambas situaciones radica en que ahora la magnitud de la aberración no depende de la profundidad de focalización, sino del espesor de la lámina dieléctrica.

Para el caso particular en el que el índice de refracción de la lámina dieléctrica no difiere mucho del índice de refracción del medio que la rodea<sup>6</sup>, podemos escribir

$$\cos \theta_2 \approx \cos \theta_1 \left( 1 + \frac{\Delta n}{n_1} \tan^2 \theta_1 \right), \quad (3.6)$$

siendo  $\Delta n = n_2 - n_1$ . En este caso

---

<sup>6</sup> Para objetivos de apertura numérica alta debe satisfacerse  $\Delta n/n_1 < 0.05$ , obteniendo así un error relativo inferior al 5%.

$$W(\theta_1; t, \Delta n) = \frac{t}{\lambda} \Delta n \sec \theta_1. \quad (3.7)$$

### 3.1.3. Medio con N-1 interfases

Para calcular el caso más general, en el que el frente esférico emergente del objetivo focaliza a través de  $N - 1$  interfases, hacemos uso de la propiedad, utilizada en el apartado anterior, de que la aberración total se calcula como la suma de las aberraciones introducidas por cada una de las interfases [Török y Varga 1997]. Así obtenemos

$$W(\theta_1; d_1, d_2, d_3, \dots) = \frac{1}{\lambda} \sum_{i=1}^{N-1} d_i (n_{i+1} \cos \theta_{i+1} - n_i \cos \theta_i). \quad (3.8)$$

Como las sucesivas refracciones se producen de acuerdo con la ley de Snell, esta función de aberración está determinada por el ángulo  $\theta_1$  y por tanto describe una aberración esférica.

### 3.2. Aberración introducida por variaciones en la longitud de tubo

La aberración esférica puede producirse también en aquellas situaciones en las que el objetivo de microscopio no trabaja con la longitud de tubo para la que está diseñado. Para analizar esta situación consideremos un sistema telecéntrico como el que se ilustra en la Fig. 3.4. Para evaluar la aberración inducida cuando el microscopio enfoca a un plano separado una distancia  $\Delta f$  del foco objeto del objetivo, basta con calcular, para cada ángulo de incidencia  $\theta_1$  la diferencia de camino óptico  $n_1 h_1 - n_2 h_2$ , esto es

$$W^{LT}(\theta_1; \Delta f) = \frac{1}{\lambda} [n_1 h_1(\theta_1) - n_2 h_2(\theta_1)] = \frac{1}{\lambda} (n_1 \Delta f \cos \theta_1 - n_2 \Delta f_L \cos \theta_2). \quad (3.9)$$

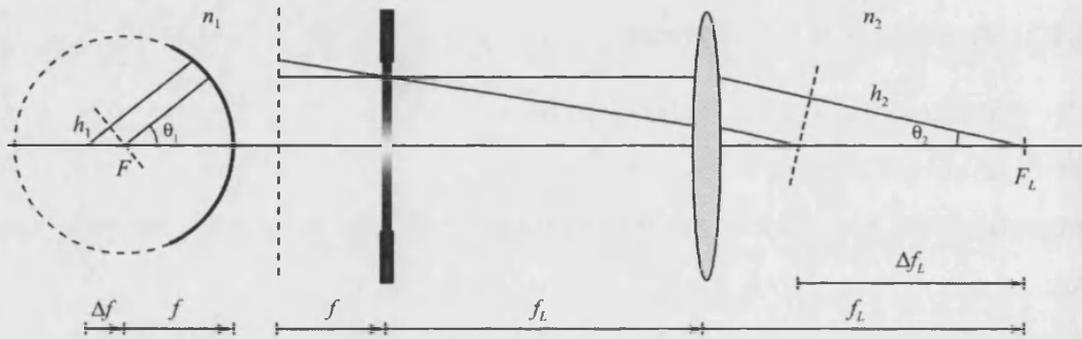


Fig. 3.4. Esquema de un sistema telecéntrico trabajando con diferentes longitudes de tubo.

Teniendo en cuenta que el aumento lateral

$$M = -\frac{f_L}{f} = \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2}, \quad (3.10)$$

tenemos que

$$\cos \theta_2 = \sqrt{1 - \left(\frac{\sin \theta_1}{M}\right)^2} \approx 1 - \frac{1}{2} \left(\frac{\sin \theta_1}{M}\right)^2, \quad (3.11)$$

donde se ha tenido en cuenta que siempre que el objetivo tenga apertura numérica alta  $\sin \theta_1 \ll M$ . Sustituyendo la Ec. (3.11) en la Ec. (3.9) obtenemos

$$W^{LT}(\theta_1; \Delta f) = \frac{1}{\lambda} \left( \frac{n_2}{2M^2} \Delta f_L \sin^2 \theta_1 - n_2 \Delta f_L + n_1 \Delta f \cos \theta_1 \right). \quad (3.12)$$

También para este caso, la función de aberración depende únicamente del ángulo azimutal  $\theta_1$  y por tanto, está describiendo una aberración esférica. Nótese que los dos últimos términos de la Ec. (3.12) hacen referencia a un término de fase constante y otro de desenfoque, respectivamente.

En el caso en el que esta distorsión de fase tenga signo opuesto a la aberración esférica inducida por un medio estratificado, el efecto neto de ambas fuentes de aberración puede dar lugar a la compensación de la aberración esférica [Ke y Gu 1998; Sheppard y Gu 1991; Sheppard y Gu 1992; Sheppard *et al.* 1994; Reihani *et al.* 2006].

### 3.3. Desarrollo en serie de la función de aberración: aberración esférica primaria

A continuación vamos a realizar una expansión en serie de potencias de la función de aberración en términos de  $s = \sin(\theta_1/2)$ . Este desarrollo permitirá reconocer fácilmente un efecto de desenfoque, ya que aparece un término en  $s^2$  [Sheppard y Cogswell 1991; Sheppard 1995], o los diferentes órdenes de aberración esférica.

#### 3.3.1. Medio estratificado

Abordemos en primer lugar el caso de una lámina dieléctrica de índice de refracción  $n_2$  sumergida en un medio de índice  $n_1$ . Teniendo en cuenta la ley de Snell podemos escribir

$$\cos\theta_1 = 1 - 2s^2, \quad \cos\theta_2 = \sqrt{1 - \frac{4n_1^2}{n_2^2} s^2 (1 - s^2)}. \quad (3.13)$$

Sustituyendo estas expresiones en la Ec. (3.5), y realizando un desarrollo en serie de potencias obtenemos

$$W(\theta_1; t) = \frac{1}{\lambda} t (n_2 - n_1) \times \left[ 1 + \frac{2n_1}{n_2} s^2 + 2(n_2 + n_1) \frac{n_1^2}{n_2^3} s^4 + 4(n_2 + n_1) \frac{n_1^4}{n_2^5} s^6 + \dots \right]. \quad (3.14)$$

El término en  $s^2$  representa exclusivamente el desenfoque introducido por la lámina dieléctrica; es decir, da cuenta del cambio en la posición paraxial de focalización inducida por la lámina. De ahora en adelante, obviaremos este término de desplazamiento axial. El sumando en  $s^4$  se refiere a la aberración esférica primaria (también llamada de cuarto orden), el término en  $s^6$  a la aberración esférica de sexto orden y, así sucesivamente con los términos de orden superior. Esta ecuación también puede ser usada para evaluar la aberración generada al focalizar a través de una única interfase. Para ello basta con sustituir el parámetro  $t$  por la distancia de focalización  $d$ . Se ha demostrado que las aberraciones esféricas de órdenes superiores influyen débilmente en la respuesta axial [Sheppard *et al.* 1994]. Por ello, en los estudios que realicemos en capítulos posteriores nos restringiremos a estudiar el efecto de la aberración esférica primaria.

Si se expresa la función de aberración en términos de la variable normalizada  $s_N = s/s_{\max}$ , donde  $s_{\max} = \sin(\alpha/2)$ , el coeficiente que acompaña a la aberración esférica primaria,  $s_N^4$ , es

$$w_{40}^{n_1, n_2} = \frac{2}{\lambda} t (n_2^2 - n_1^2) \frac{n_1^2}{n_2^3} \sin^4 \left( \frac{\alpha}{2} \right). \quad (3.15)$$

No se debe olvidar que la definición de aberración esférica primaria depende del tipo de desarrollo que se haya llevado a cabo. En este sentido, una expansión en términos de  $s = \sin \theta_1$  o de  $s = \tan \theta_1$  daría lugar a un coeficiente de aberración esférica primaria diferente. Sin embargo, esas expansiones no resultan muy convenientes ya que no permiten aislar el efecto del desenfoque.

Si aplicamos el mismo procedimiento al caso de focalización a través de un medio estratificado con dos interfases y tres medios de diferente índice de refracción, obtenemos

$$w_{40}^{n_1, n_2, n_3} = \frac{2}{\lambda} n_1^2 \left[ \frac{(d_1 - d_2)(n_2^2 - n_1^2)}{n_2^3} + \frac{d_2(n_3^2 - n_1^2)}{n_3^3} \right] \sin^4 \left( \frac{\alpha}{2} \right). \quad (3.16)$$

De forma análoga puede llevarse a cabo este desarrollo para un número arbitrario de interfases.

### 3.3.2. Variaciones en la longitud de tubo

También en el caso de la aberración esférica inducida por cambio de la longitud de tubo, se puede realizar una expansión de la función de aberración en términos de  $s = \sin(\theta_1/2)$ . Para ello, introducimos las identidades

$$\begin{aligned} \cos \theta_1 &= 1 - 2s^2, \\ \sin \theta_1 &= 2s\sqrt{1 - s^2}, \end{aligned} \quad (3.17)$$

en la Ec. (3.12), obteniéndose

$$W^{LT}(\theta_1; \Delta f) = \frac{1}{\lambda} \left[ (n_1 \Delta f - n_2 \Delta f_L) + 2 \Delta f (n_2 - n_1) s^2 - 2 n_2 \Delta f s^4 \right], \quad (3.18)$$

donde se ha tenido en cuenta que el aumento axial es  $M^2 = \Delta f_L / \Delta f$ . Nótese que las variaciones en la longitud de tubo inducen sólo aberración esférica primaria y desenfoque. Además, éste último se anula en el caso particular de considerar  $n_1 = n_2$ .

El coeficiente de aberración esférica primaria viene dado por

$$w_{40}^{LT}(\theta_1; \Delta f) = -2 n_2 \Delta f \sin^4 \left( \frac{\alpha}{2} \right). \quad (3.19)$$

Es directo generalizar los resultados obtenidos en este apartado para el caso en que estén presentes ambas fuentes de aberración esférica, tanto la inducida por un medio estratificado como la producida por un objetivo trabajando con una longitud de tubo diferente a la de diseño. Para ello basta con sumar los correspondientes coeficientes de aberración esférica. De forma compacta, la aberración esférica primaria puede escribirse de la forma

$$\Phi_{AE}(\theta_1) = 2\pi w_{40} \frac{\sin^4 \left( \frac{\theta_1}{2} \right)}{\sin^4 \left( \frac{\alpha}{2} \right)}, \quad (3.20)$$

donde el coeficiente  $w_{40}$  tendrá distintas expresiones dependiendo del caso que se esté estudiando.

### 3.4. Distribución focal de amplitudes con aberración esférica

La imagen tridimensional de un sistema puede verse fuertemente degradada debido a la aberración esférica inducida en el proceso de focalización. Nosotros centraremos nuestro estudio en la aberración esférica inducida en un medio estratificado por ser un problema de enorme importancia en microscopía, especialmente en el campo de la biología.

#### 3.4.1. Sistemas con apertura numérica alta

Para incorporar los efectos de la aberración esférica a la formulación desarrollada en el Capítulo 2, que describe el proceso de formación de imágenes en un microscopio, basta con añadir el correspondiente término de fase a la Ec. (2.18); esto es

$$h(r_N, z_N; w_{40}) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^\alpha P(\theta) \exp[i\Phi_{AE}(\theta)] J_0\left(2\pi r_N \frac{\sin\theta}{\sin\alpha}\right) \times \exp\left[-i2\pi z_N \frac{\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}\right] \sin\theta d\theta. \quad (3.21)$$

Como ejemplo para ilustrar el impacto de la aberración esférica inducida por un medio estratificado en la Fig. 3.5 hemos representado, en sección meridional, el módulo al cuadrado de la Ec. (3.21). Para los cálculos hemos considerado los siguientes parámetros  $\lambda = 633 \text{ nm}$ ,  $AN = 1.4$ ,  $n_1 = 1.52$  (aceite),  $n_2 = 1.33$  (agua). Las distancias de focalización  $d = 0, 10.1\mu\text{m}, 20.2\mu\text{m}$  y  $30.3\mu\text{m}$  dan lugar a los siguientes coeficientes de aberración

esférica:  $w_{40} = 0, -1, -2, -3$ . Esta figura muestra claramente la fuerte influencia de la aberración esférica en la forma del volumen focal.

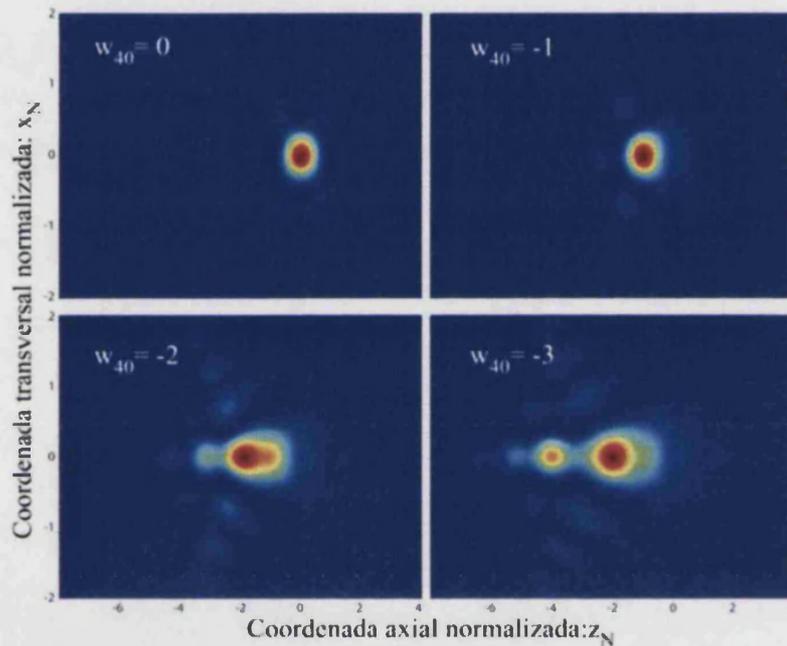


Fig. 3.5. Evaluación numérica de la distribución de intensidad en la región focal para  $w_{40} = 0, -1, -2$  y  $-3$  con pupila circular.

A pesar de que la Ec. (3.21) es una fórmula bastante compacta, es difícil extraer de ella información que permita, de manera intuitiva, la generación de técnicas para la reducción del impacto de la aberración esférica. Por ello, preferimos trabajar con una fórmula más simple, que proporciona sólo información parcial del fenómeno, pero que constituye una buena herramienta para abordar el diseño de nuevas estrategias de compensación de la aberración esférica. Con este fin, particularizamos la Ec. (3.21) para los puntos del eje óptico, y llevamos a cabo la transformación

$$\xi = \frac{\cos\theta - \cos\alpha}{\cos\alpha - 1} + 0.5; \quad q(\xi) = P(\theta), \quad (3.22)$$

obteniendo

$$h(0, z_N; w_{40}) = \frac{i2\pi(1 - \cos\alpha)}{\lambda} \times \int_{-0.5}^{0.5} q(\xi) \exp(i2\pi w_{40} \xi^2) \exp[-i2\pi(z_N - w_{40})\xi] d\xi. \quad (3.23)$$

El módulo al cuadrado de esta expresión se muestra, para el caso estándar de un objetivo con pupila circular, en la Fig. 3.6 para diferentes valores del coeficiente de aberración esférica.

La integral de la Ec. (3.23) es la transformada de Fourier 1D de la función  $q(\xi; w_{40}) = q(\xi) \exp(i2\pi w_{40} \xi^2)$ . A esta función  $q(\xi; w_{40})$  la denominamos función pupila generalizada ya que incluye las modificaciones del frente de ondas inducidas tanto por la propia función pupila como por la focalización a través del medio estratificado. Dicha transformada, en términos de  $z_N$ , aparece desplazada en una cantidad dada precisamente por el valor del coeficiente de aberración esférica  $w_{40}$ . En algunos casos, representaremos estas distribuciones axiales en términos de la variable  $z'_N = z_N - w_{40}$ , que denominamos coordenada axial reducida.

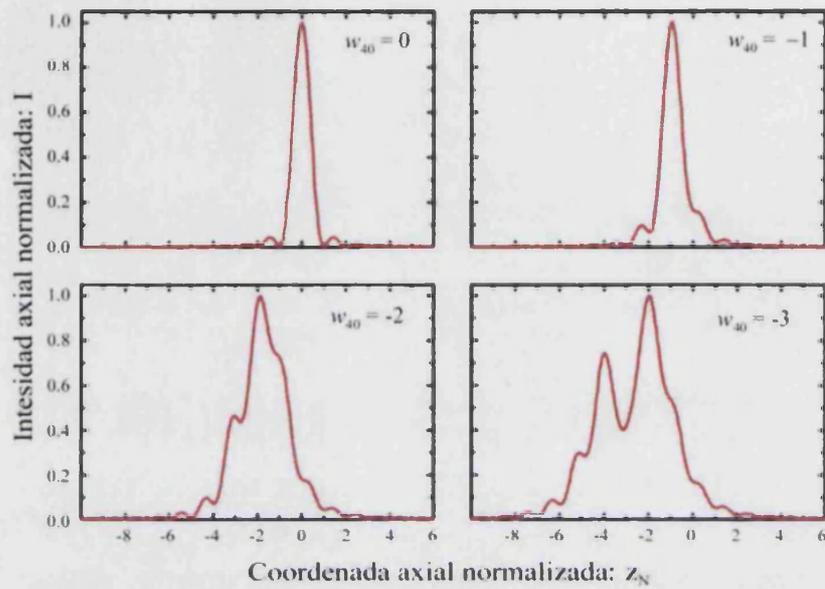


Fig. 3.6. Distribución de intensidad axial con  $w_{40} = 0, -1, -2$  y  $-3$  para la pupila circular.

### 3.4.2. Aproximación paraxial

El formalismo que hemos presentado es válido para valores arbitrarios de la apertura numérica. Analizamos ahora más detenidamente el caso paraxial. En estas condiciones, donde los ángulos de apertura son pequeños, podemos realizar las aproximaciones

$$\begin{aligned} \sin \alpha &\approx \alpha = \frac{r_{\max}}{f}, \\ \sin \theta &\approx \theta = \frac{r}{f}. \end{aligned} \tag{3.24}$$

Introduciendo estas aproximaciones en la Ec. (3.21) podemos obtener la distribución tridimensional de amplitudes del campo eléctrico en la región focal dentro del régimen paraxial

$$h_p(r_{N,p}, z_{N,p}; w_{40,p}) = \frac{i2\pi r_{\max}^2}{\lambda f^2} \int_0^1 P(\rho) \exp[i\Phi_{AE,p}(\rho)] J_0(2\pi r_{N,p}\rho) \times \exp(-i2\pi z_{N,p}\rho^2) \rho d\rho, \quad (3.25)$$

donde se ha introducido el subíndice  $p$  para indicar la aproximación paraxial y

$$\begin{aligned} r_{N,p} &= \frac{r_{\max}}{\lambda f} nr, \\ z_{N,p} &= \frac{nr^2}{2\lambda f^2} z, \\ \Phi_{SA,p} &= 2\pi w_{40,p} \rho^4, \end{aligned} \quad (3.26)$$

que junto con  $w_{40,p}$  son los nuevos parámetros aproximados de acuerdo con los criterios paraxiales. Nótese que, cuando introducimos estas condiciones en la función de aberración conseguimos una dependencia para la misma en  $\rho^4$ , lo que es bien conocido como aberración esférica primaria [Mahajan 1991] y de ahí el nombre que le dimos cuando trabajábamos en apertura numérica alta. Como era de esperar, la Ec. (3.25) coincide con la obtenida directamente de las ecuaciones de difracción de Fresnel, válidas exclusivamente en el régimen paraxial [Born y Wolf 1999].

Nuevamente, podemos particularizar al caso axial y, tras aplicar el cambio de variable

$$\xi = \rho^2 - 0.5; \quad q(\xi) = p(\rho) , \quad (3.27)$$

obtenemos

$$\begin{aligned} h_p(0, z_{N,p}; w_{40,p}) &= \\ &= \int_{-0.5}^{0.5} q(\xi) \exp(i2\pi w_{40,p} \xi^2) \exp[-i2\pi(z_{N,p} - w_{40,p}) \xi] d\xi , \end{aligned} \quad (3.28)$$

donde se han omitido algunos factores constantes. Esta expresión es análoga a la Ec. (3.23) y se ha obtenido tras aplicar la versión paraxial del cambio de variable de la Ec. (3.22).

En definitiva, el comportamiento axial de un sistema focalizador a través de un medio estratificado viene regido por la misma integral, tanto en régimen paraxial como en apertura numérica alta. Aún así, no hay que olvidar que para una misma función pupila proyectada  $q(\xi)$ , la función pupila real  $p(\rho)$ , es distinta en función de la apertura numérica del sistema y, en el caso de sistemas con valores altos de la misma, de las condiciones que determinan la inclinación de los rayos.

### 3.5. Analogía entre aberración esférica y difracción 1D

Un resultado similar a la distribución de intensidad axial con aberración esférica, Ec. (3.23), podemos encontrarlo en el estudio de un sistema focalizador 1D. Consideremos el sistema focalizador que se ilustra en la

Fig. 3.7, donde una onda plana y monocromática ilumina una lente cilíndrica. Una rendija, que actúa de diafragma de apertura, se sitúa en el plano focal objeto de la misma. Es trivial deducir que la distribución de amplitudes en el plano focal imagen de la lente se relaciona con la distribución de amplitudes en el plano focal objeto mediante una transformada de Fourier [Goodman 1996]. Expresado en términos matemáticos

$$u(x; z = 0) = \tilde{p}\left(\frac{x}{\lambda f_x}\right). \quad (3.29)$$

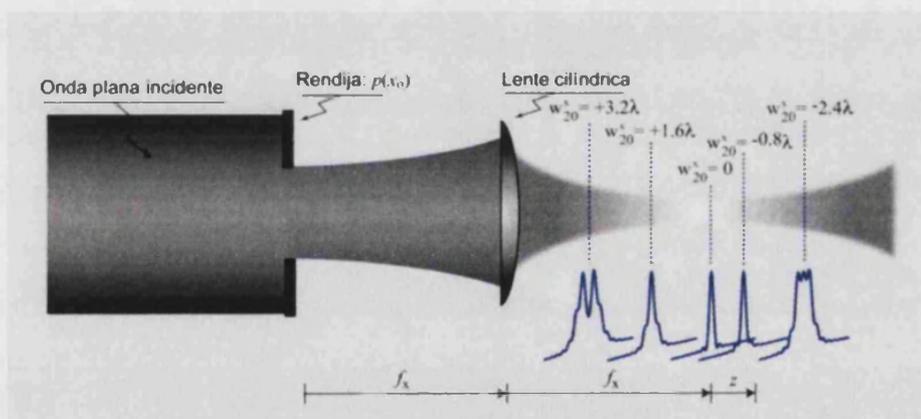


Fig. 3.7. Patrones de difracción 1D obtenidos al focalizar mediante una lente cilíndrica la luz procedente de una rendija.

La distribución de amplitud en planos desenfocados vendrá dada por la convolución entre  $u(x; 0)$  y la respuesta impulsional en el espacio libre, es decir

$$u(x; z) = \tilde{p}\left(\frac{x}{\lambda f_x}\right) \otimes \exp\left(i\frac{k}{2z}x^2\right), \quad (3.30)$$

donde se han omitido algunos factores constantes. Expresando la convolución en su forma integral obtenemos

$$u(x; z) = \int_{-0.5}^{0.5} p(x_0) \exp(i2\pi w_{20}^x x_0^2) \exp\left(-i \frac{2\pi\Delta}{\lambda f_x} x x_0\right) dx_0, \quad (3.31)$$

donde hemos definido el coeficiente de desenfoque 1D como

$$w_{20}^x = -\frac{z\Delta^2}{2\lambda f_x^2}, \quad (3.32)$$

siendo  $\Delta$  la anchura de la rendija.

Es fácil comprobar que el coeficiente de desenfoque 1D,  $w_{20}^x$ , desempeña en la Ec. (3.31) la misma función que el coeficiente de aberración esférica  $w_{40}$  en la Ec. (3.23). Los patrones mostrados en las Figs. 3.6 y 3.7 son similares, con la única diferencia de que en el caso de la aberración esférica, el perfil no es simétrico debido a que hemos considerado que el sistema satisface la condición del seno.

De esta manera, podemos concluir que la distribución de intensidad axial de un sistema focalizador de apertura numérica alta, con cierta cantidad de aberración esférica inducida, es igual a la distribución de intensidad transversal obtenida a una cierta distancia  $z$  del plano focal imagen en un experimento de focalización 1D.

### 3.6. Análisis de la sensibilidad a la aberración esférica de algunas pupilas

La búsqueda de estrategias para reducir la aberración esférica en los diferentes sistemas ópticos ha atraído interés creciente en los últimos años. Entre ellas se encuentra la posibilidad de corregir dichas distorsiones de fase mediante alteraciones en la longitud de tubo del objetivo de microscopio, como ya hemos comentado anteriormente, o mediante un anillo de corrección que llevan incorporados algunos objetivos. Dicho anillo permite reajustar la posición interna de los distintos elementos para compensar las distorsiones de fase. Cabe señalar, que la aberración esférica, dada por la Ec. (3.20) depende, en la mayor parte de situaciones, de la profundidad de focalización sobre la muestra, a través del coeficiente  $w_{40}$ . Por ello, estas técnicas no proporcionan una corrección dinámica de la aberración esférica que se induce durante el proceso de barrido en un sistema de microscopía. Nosotros nos centramos en otra técnica basada en el empleo de filtros pupilares los cuales, con una mínima modificación de la arquitectura óptica, permiten una reducción considerable de los efectos de la aberración esférica para todo el grosor de la muestra.

A continuación analizamos la sensibilidad a la aberración esférica de diferentes filtros pupilares.

#### 3.6.1. Pupila gaussiana invertida

En el régimen paraxial, una pupila de transmitancia gaussiana proporciona un volumen focal cuya forma y posición cambia lentamente con la aberración esférica [Mills y Thompson 1986]. Nótese, sin embargo, que una

pupila gaussiana no es una solución realista para el problema de aberración esférica ya que, con este tipo de pupilas se produce una reducción de la apertura numérica efectiva del objetivo de microscopio [Sheppard *et al.* 1994].

Con todo ello, para aprovechar las ventajas de las pupilas gaussianas, aunque evitando la disminución en la apertura numérica del sistema, haremos uso de la Ec. (3.23) así como del concepto de invarianza axial para filtros pupilares llevado a cabo por Campos *et al.* [2000]. En este trabajo, los autores establecen las condiciones que deben satisfacer los filtros para producir una respuesta axial idéntica.

En primer lugar, consideremos una función pupila de transmitancia en amplitud gaussiana, que expresada en términos del ángulo  $\theta$  queda de la forma

$$p(\theta) = \exp \left[ - \left( \frac{\sin \theta}{\omega \sin \alpha} \right)^2 \right], \quad (3.33)$$

siendo  $2\omega$  la anchura de la función en el punto  $1/e$ .

Aplicando el cambio de variable descrito por la Ec. (3.22) a esta función pupila, podemos definir

$$Q(\xi) = \exp \left[ - \frac{1 - [\cos^2(\alpha/2) - 2\xi \sin^2(\alpha/2)]^2}{(\omega \sin \alpha)^2} \right]. \quad (3.34)$$

Nótese que en este cambio de variable no hemos incluido el factor  $\sqrt{\cos\theta}$  procedente de la condición del seno. Finalmente construimos una función pupila de idéntica respuesta axial aunque con opuesta respuesta transversal tal que

$$\bar{Q}(\xi) = Q(-\xi), \quad (3.35)$$

de tal forma que el filtro gaussiano invertido vendrá dado por la función  $t(\rho)$ , ver Fig. 3.8, que resulta de deshacer el cambio de variable descrito por la Ec. (3.22) en  $\bar{Q}(\xi)$ ,

$$t(\rho) = \exp \left\{ - \frac{1 - \left[ 2 \cos^2(\alpha/2) - \sqrt{1 - \rho^2 \sin^2 \alpha} \right]^2}{\omega^2 \sin^2 \alpha} \right\}. \quad (3.36)$$

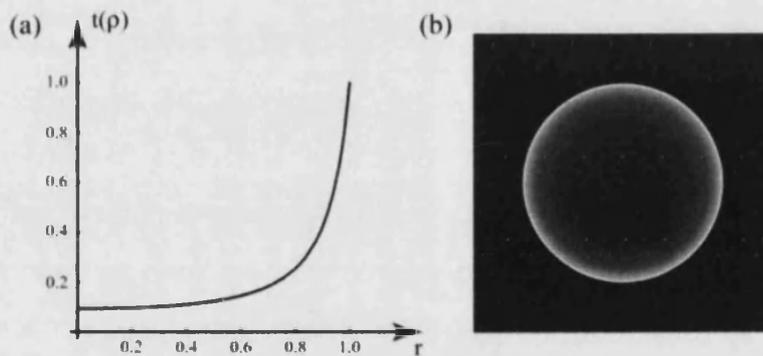


Fig. 3.8. (a) Transmitancia en amplitud del filtro gaussiano invertido;  
(b) Representación en niveles de gris.

En la Fig. 3.9 se muestra la distribución de intensidad axial de un sistema focalizador, de  $AN = 1.4$  en aceite, para una pupila gaussiana invertida con diferentes cantidades del coeficiente de aberración esférica.

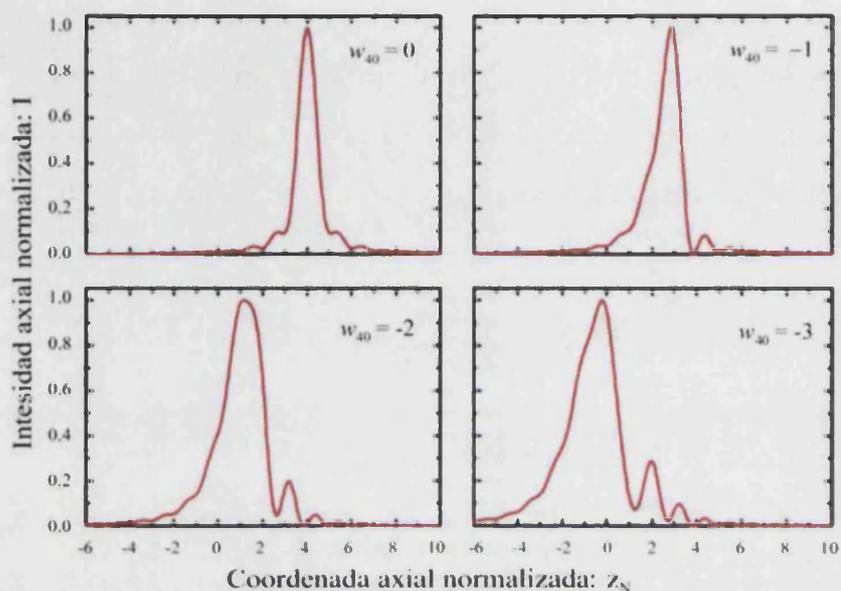


Fig. 3.9. Distribución de intensidad axial con  $w_{40} = 0, -1, -2$  y  $-3$  para la pupila gaussiana invertida. Hemos considerado  $\omega = 0.65$ .

Comparando la Fig. 3.9 con la Fig. 3.6, comprobamos que el filtro gaussiano invertido reduce la degradación de la distribución de intensidad axial al incrementar la aberración esférica en comparación con la pupila circular [Escobar *et al.* 2006]. Naturalmente, el comportamiento de un sistema focalizador de apertura numérica alta debería ser evaluado no sólo en términos de su comportamiento axial, sino también habría que tener en cuenta la distribución de intensidad transversal del mismo. Dicho comportamiento se ilustra en la Fig. 3.10 en los planos de mejor foco, es decir, en aquellos planos para los que la irradiancia axial es máxima.

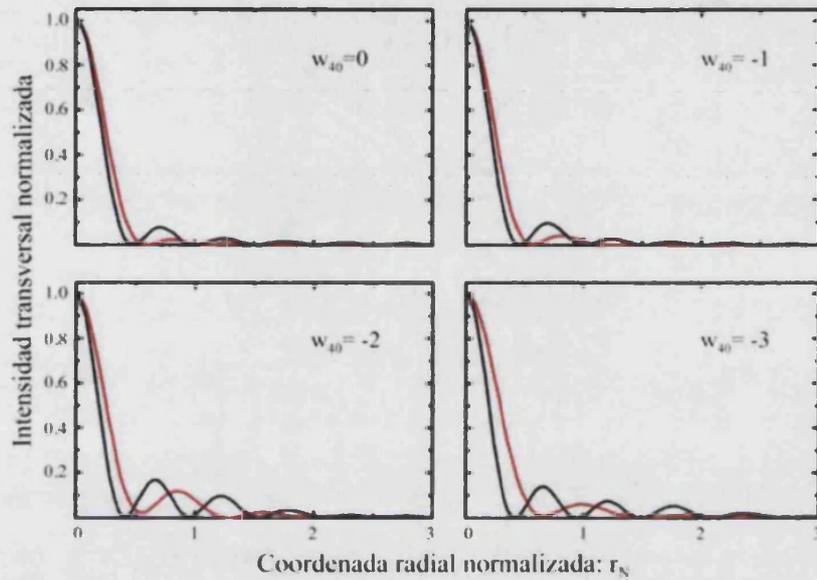


Fig. 3.10. Distribución de intensidad transversal con  $w_{40} = 0, -1, -2$  y  $-3$  para (—) pupila circular y (---) filtro gaussiano invertido.

Como podemos ver, la aberración esférica apenas afecta las distribuciones de intensidades transversales calculadas en los planos de mejor foco. Por tanto, ambos filtros mantienen sus respuestas casi inalteradas al ir incrementando el coeficiente de aberración esférica primaria. Para ver este efecto de una manera más intuitiva, vamos a llevar a cabo una simulación numérica, tanto para la pupila circular como para el filtro gaussiano invertido, sobre la imagen, en el plano de mejor foco, de un test radial estándar como el que se muestra en la Fig. 3.11. Este objeto es empleado frecuentemente ya que representa una distribución radial de frecuencias espaciales que crecen linealmente desde el borde hasta el centro del test. Las regiones anulares que son resueltas por el sistema representan las frecuencias que éste deja pasar a la imagen.

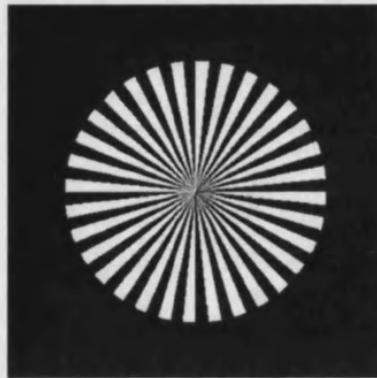


Fig. 3.11. Test radial estándar.

Así pues, en la Fig. 3.12 se presentan los resultados numéricos correspondientes a las imágenes obtenidas para los correspondientes planos de mejor foco con el filtro gaussiano invertido y la pupila circular. De todo esto podemos deducir que la aberración esférica inducida en un medio estratificado es de gran importancia exclusivamente en la dirección axial. Siempre que sea posible hacer coincidir el plano imagen con el de mejor foco, las modificaciones que puede sufrir la distribución de intensidad transversal con el incremento de aberración esférica son apenas perceptibles.

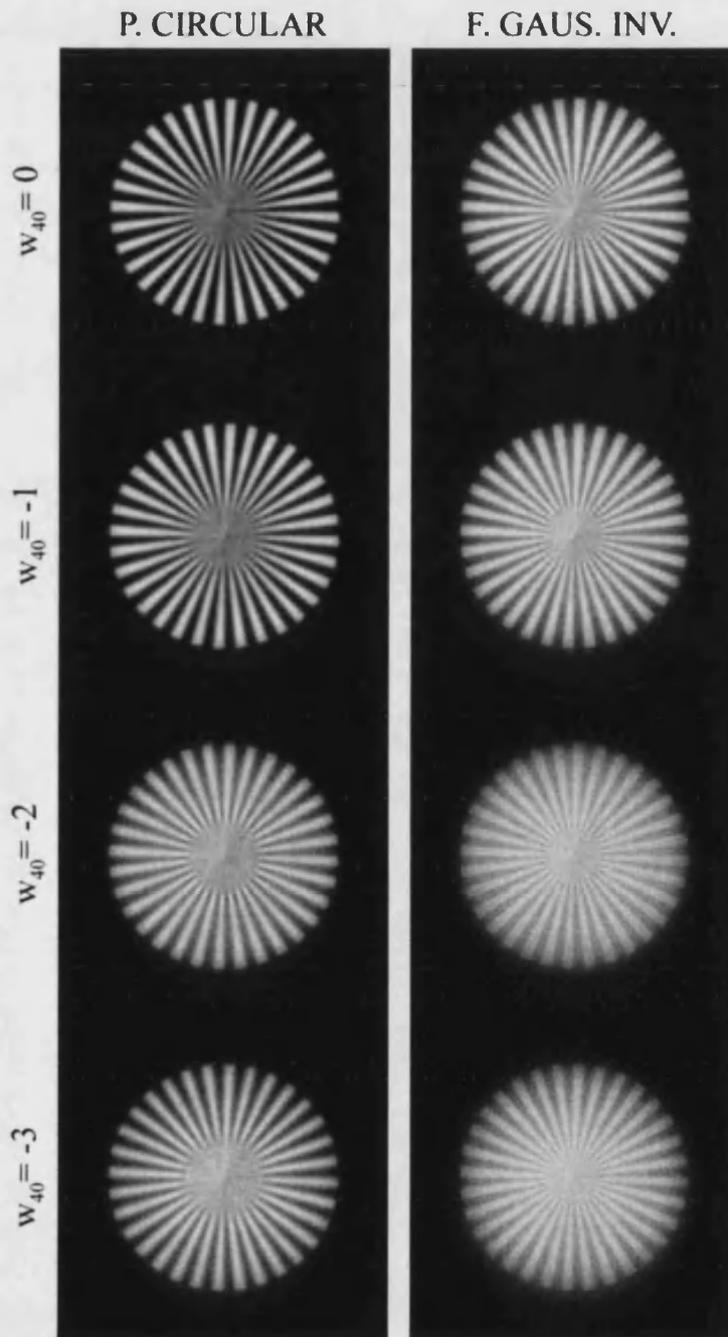


Fig. 3.12. Simulación numérica de formación de imágenes con objeto 2D para la pupila circular y el filtro gaussiano invertido.

Sin embargo, en formación de imágenes con objetos tridimensionales, los efectos de estas distorsiones de fase afectarán enormemente a la calidad de la imagen final, debido al enorme deterioro de la respuesta axial del sistema. A continuación llevamos a cabo una simulación numérica, tanto para la pupila circular como para el filtro gaussiano invertido, de formación de imágenes con un objeto tridimensional. En nuestra simulación utilizamos un objeto 3D muy simple, ya que está compuesto por dos pantallas planas. En particular escogemos el test radial empleado anteriormente, y un test circular al estilo de una placa zonal de Fresnel. Las dos pantallas se disponen perpendiculares al eje óptico y separadas una distancia  $\Delta z = 2.2 \mu\text{m}$ , ver Fig. 3.13.

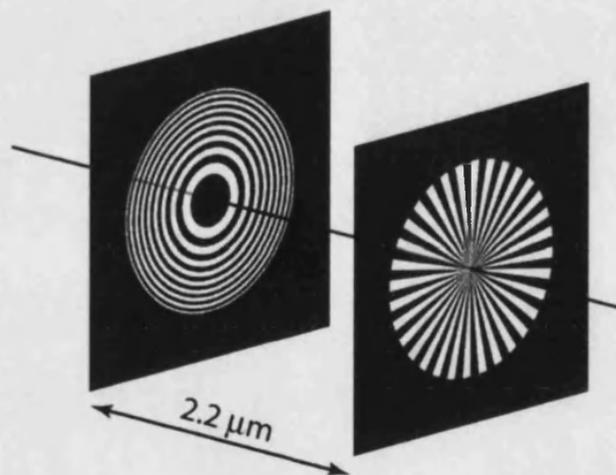


Fig. 3.13. Esquematización de un objeto tridimensional.

En la Fig. 3.14 se muestran los resultados numéricos, en los que las imágenes se construyen como la suma incoherente de las imágenes de las pantallas. En nuestro cálculo seleccionamos como plano imagen el plano de mejor foco correspondiente al test radial.

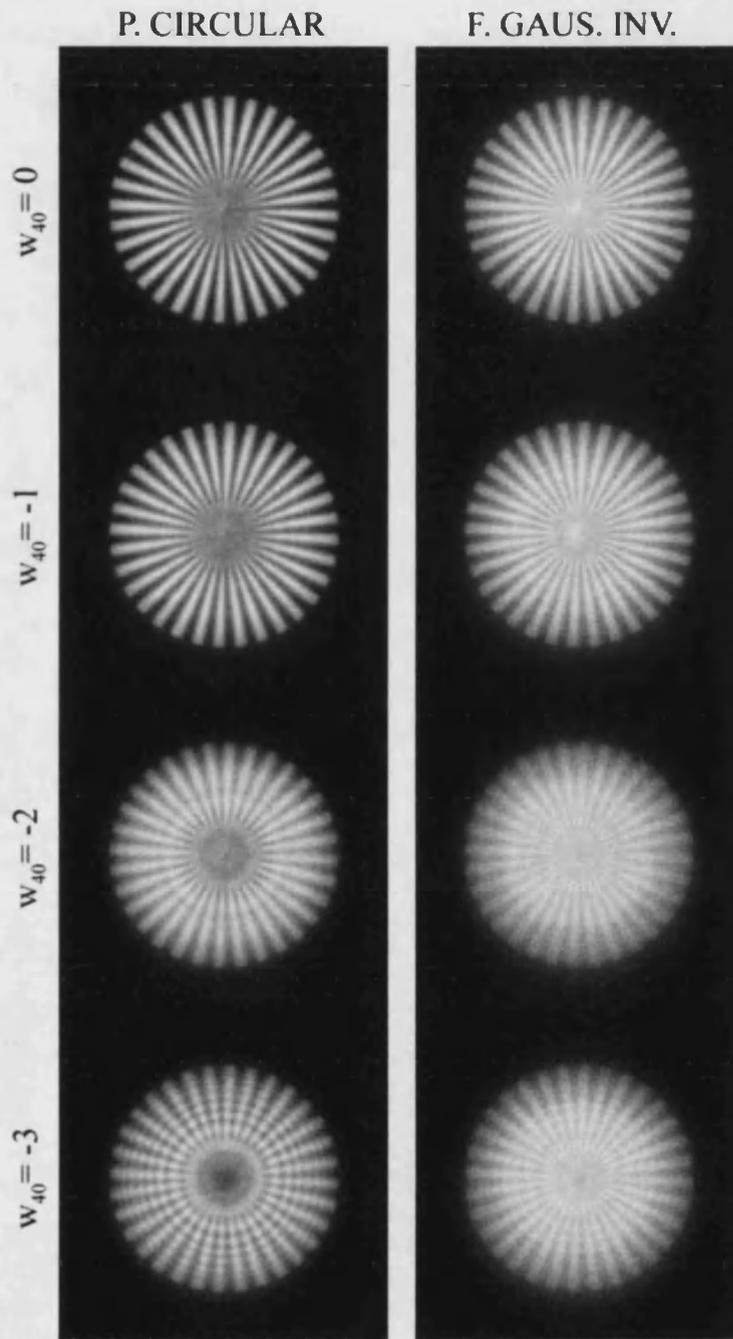


Fig. 3.14. Simulación numérica de formación de imágenes con objeto 3D para la pupila circular y el filtro gaussiano invertido.

Como podemos observar, las imágenes obtenidas con el filtro gaussiano invertido son más resistentes a la aberración esférica ya que la perturbación procedente del test circular es mucho menor.

### 3.6.2. Filtros parabólicos

En este caso, describimos un experimento sencillo, basado de nuevo en la analogía descrita previamente entre la aberración esférica y la difracción 1D, para ilustrar de distinta manera la influencia de la aberración esférica en los sistemas de microscopia [Escobar *et al.* 2008]. El esquema del dispositivo experimental empleado es el representado en la Fig. 3.15.

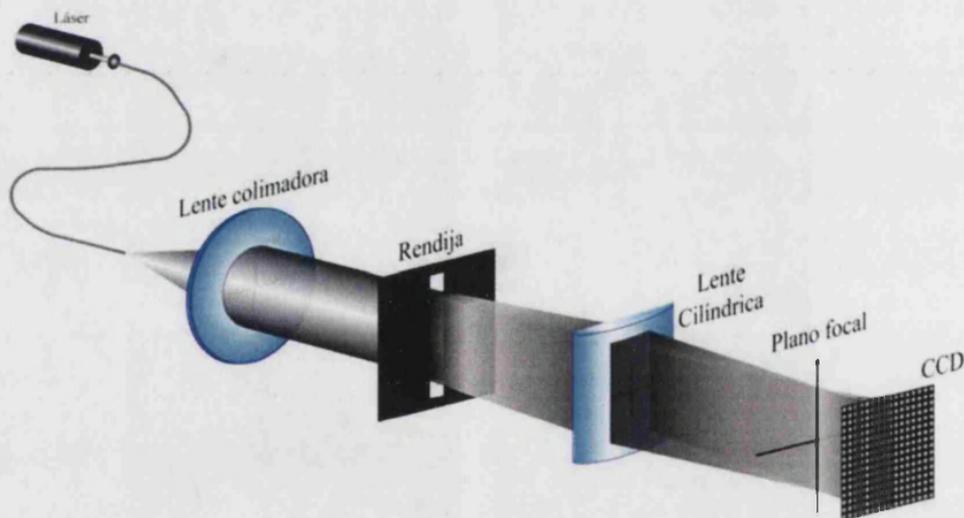


Fig. 3.15. Esquema del sistema focalizador 1D empleado.

La luz procedente de una fuente láser de He-Ne, cuya emisión es continua con  $\lambda = 632.8nm$ , es conducida a través de una fibra monomodo hasta el eje óptico del montaje. La salida del haz en la fibra será considerada como una fuente puntual. Mediante una lente colimadora,  $f_c = 200mm$ , el haz ilumina la rendija para ser posteriormente focalizado a través de una

lente cilíndrica,  $f_x = 100\text{mm}$ . Con este dispositivo tomamos imágenes 2D correspondientes a los patrones transversales para diferentes posiciones axiales, con la ayuda de una cámara CCD (Pulnix TM-765E), específicamente para  $z = 0, -1\text{ cm}, -2\text{ cm}, -3\text{ cm}$  y  $-4\text{ cm}$ , lo que, de acuerdo a la Ec. (3.32) se corresponde con los coeficientes de desenfoque  $w_{20}^x = 0, 0.8, 1.6, 2.4$  y  $3.2$ . Debido a la naturaleza unidimensional tanto de la rendija como de la lente focalizadora, las imágenes recogidas no deberían mostrar cambios a lo largo del eje de ordenadas. Sin embargo, en un experimento real esto no se satisface ya que los elementos que lo componen tienen dimensiones finitas, el campo de iluminación no es exactamente una onda plana y además, hay que añadir el ruido inherente asociado al detector electrónico que es de naturaleza bidimensional.

De esta manera, para maximizar la relación señal-ruido podemos llevar a cabo un promedio de las imágenes bidimensionales. En la Fig. 3.16 se muestran los datos experimentales de las distribuciones de intensidad transversal para una rendija clara para diferentes valores de  $z$ .

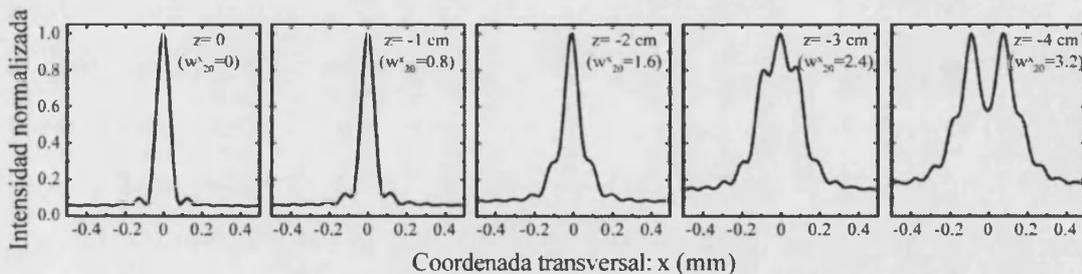


Fig. 3.16. Datos experimentales de la distribución de intensidad transversal para la pupila circular en diferentes planos de desenfoque.

Es directo observar, a partir de la figura, la degradación sufrida en los patrones unidimensionales a medida que se produce un incremento del

coeficiente de desenfoque. Al mismo tiempo, esta figura también ilustra la importancia de la degradación sufrida por el volumen focal en un sistema de apertura numérica alta con cierta cantidad de aberración esférica inducida.

Los elementos conformadores de haces además de ser muy fáciles de implementar y sencillos de entender conceptualmente, son una herramienta muy poderosa en la mejora del poder resolvente e incluso en el aumento de la profundidad de foco en los sistemas formadores de imágenes [Dickey y Holswade 2000; Jacquinot y Roizen-Dossier 1964].

Para visualizar el comportamiento de un determinado filtro de amplitud,  $p(\theta)$ , lo que tenemos que construir es una rendija, para ese determinado filtro, con transmitancia  $t(x_0)$  obtenida tras realizar el cambio de variable

$$x_0 = \frac{\sin^2(\theta/2)}{\sin^2(\alpha/2)} - 0.5. \quad (3.37)$$

A continuación vemos los resultados obtenidos cuando introducimos en el montaje descrito en la Fig. 3.15 un filtro diseñado para aumentar la profundidad de foco,  $t_1(x_0) = 1 - 4x_0^2$  y otro diseñado para obtener mayor resolución axial,  $t_2(x_0) = 4x_0^2$  (ver Fig. 3.17). Estos filtros fueron construidos con película fotográfica de alto contraste (MACO orthochromatic film).

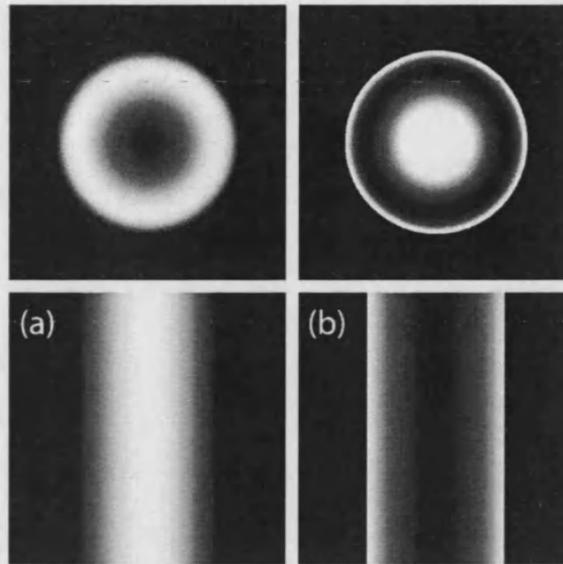


Fig. 3.17. Transmitancia de los filtros pupilares bajo estudio (línea superior) y sus filtros 1D equivalentes (a) filtro 1D de profundidad de campo; (b) filtro 1D superresolvente axialmente.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la rendija clara, obtenemos las distribuciones de intensidad transversal correspondientes a los coeficientes de desenfoque  $w_{20}^x = 0, 0.8, 1.6, 2.4$  y  $3.2$ , las cuales se representan en la Fig. 3.18.

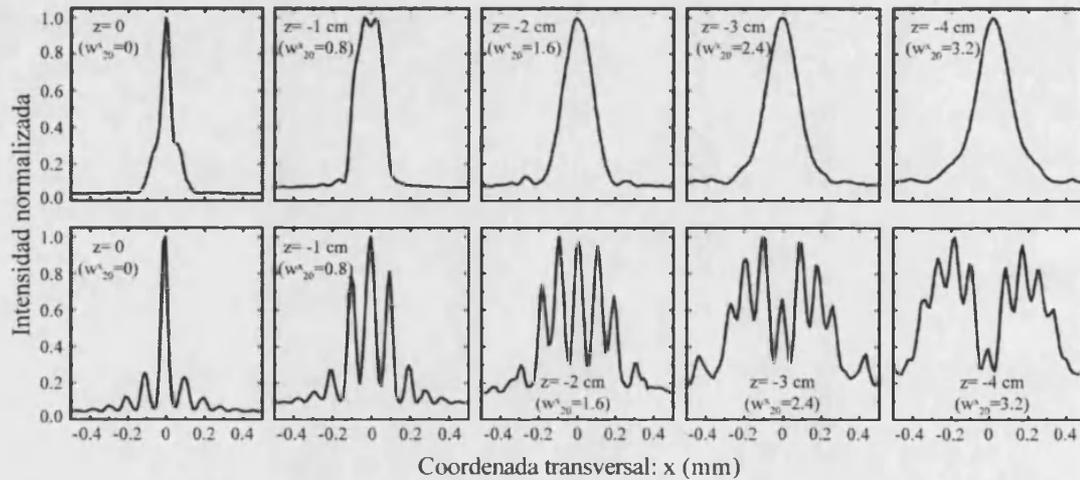


Fig. 3.18. Datos experimentales de la distribución de intensidad transversal para dos filtros en diferentes planos de desenfoque. La fila superior corresponde al filtro de profundidad de campo. La fila inferior al filtro superresolvente axialmente.

De estas curvas es directo comprender que un filtro superresolvente es muy inconveniente en sistemas susceptibles de sufrir aberración esférica. Por el contrario, los filtros diseñados para aumentar la profundidad de campo proporcionan al sistema una mayor robustez tanto para el desenfoque como para la aberración esférica.

## Capítulo 4

### Variación de parámetros estadísticos espectrales bajo distorsiones de fase

El objetivo de este capítulo es el análisis de cómo se transforma el espectro de una función  $f(x; 0)$  cuando se somete a ciertas variaciones de fase. Centramos nuestro estudio en ciertos parámetros estadísticos que caracterizan el espectro de dicha función, como son su anchura o su divergencia. En particular, analizamos el caso en el que  $f(x; 0)$  se modifica de acuerdo con la ley

$$f(x; z) = f(x; 0) e^{i\beta(x)z}, \quad (4.1)$$

donde  $\beta(x)$  es una función regular de la variable  $x$ , y donde  $z$  es el denominado parámetro de evolución de la transformación o, de forma más simple, el parámetro de propagación.

Este tipo de variaciones de fase aparecen en una gran variedad de situaciones físicas diferentes de las analizadas en el capítulo anterior. Por ejemplo, este es el tipo de modificación que sufre el espectro de la envolvente de un pulso temporal que se propaga en un medio lineal, la transfor-

mación que experimenta la función de onda de una partícula libre en mecánica cuántica, o la evolución del espectro de un campo escalar en su propagación libre.

El capítulo queda dividido en dos partes. Por un lado, se estudian dichos parámetros estadísticos en el caso de funciones continuas en todo su dominio. Este formalismo se ha empleado ya como una herramienta muy poderosa para caracterizar la propagación de un campo escalar a través de sistemas ópticos sin *fronteras abruptas* [Belanger 1991; Lü *et al.* 1999; Martínez-Herrero *et al.* 1995b; Serna *et al.* 1991; Siegman 1990; Weber 1992].

En el segundo apartado, presentamos el formalismo adecuado que nos permite llevar a cabo el mismo estudio en funciones con discontinuidades finitas, que es el caso más común para las situaciones analizadas en el Capítulo 3, dado que disponemos de ciertas limitaciones en el tamaño de los elementos ópticos que pueden hacer que las pupilas no sean continuas en todo su dominio. Este análisis se ha empleado ya para caracterizar el comportamiento espacial de campos difractados por aperturas que poseen *bordes abruptos*. Para ello se ha usado una variedad de métodos, tales como los momentos de segundo orden generalizados [Martínez-Herrero y Mejías 1993], la aproximación asintótica [Belanger *et al.* 1994; Pare y Belanger 1996] y los momentos ponderados basados en la función de distribución de Wigner con ventana [Scholl *et al.* 1996], entre otros. A lo largo de este capítulo, se desarrolla el formalismo de los momentos de segundo orden generalizados porque presenta la ventaja de proporcionar expresiones analíticas generales para las leyes de transformación que son similares

al caso de funciones continuas en todo su dominio [Lü y Luo 2001; Lü y Luo 2004; Martínez-Herrero *et al.* 2003].

Finalmente, se realizan las correspondientes analogías entre el formalismo matemático desarrollado y el estudio llevado a cabo en el capítulo anterior.

#### 4.1. Funciones continuas

En este apartado nos centramos en funciones 1D continuas en todo su dominio. El propósito del mismo es obtener unas leyes de transformación que nos permitan, de forma simple, estudiar ciertas características de interés de las funciones en cuestión, como por ejemplo cómo evoluciona la anchura del espectro de la función con el parámetro de propagación. Aunque anteriormente hemos comentado que este no es el caso más común en la situación que pretendemos estudiar, es interesante analizarlo en primer lugar porque nos servirá de soporte para el estudio de las funciones con discontinuidades finitas.

##### 4.1.1. Definición de parámetros

Sea una función de variable real  $f(x)$  continua, derivable y de módulo integrable en todo  $\mathbb{R}$ , cuya transformada de Fourier viene dada por

$$F(u) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-i2\pi ux} dx. \quad (4.2)$$

De acuerdo con el teorema de Fourier, se cumplirá

$$f(x) = \int_{-\infty}^{\infty} F(u) e^{i2\pi ux} du. \quad (43)$$

Estas expresiones nos relacionan de forma directa dos espacios recíprocos, el espacial y el de frecuencias espaciales y, por tanto, ambas ecuaciones nos proporcionan la misma información [Gaskill, 1978].

Consideremos ahora algunos parámetros estadísticos de la función  $f(x)$ . Definimos el momento de orden  $n$  para la variable  $x$  (en términos del módulo al cuadrado de  $f(x)$ ) mediante la expresión

$$\langle x^n \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} x^n |f(x)|^2 dx. \quad (44)$$

Podemos realizar ciertas manipulaciones de esta expresión para obtener  $\langle x^n \rangle$  en términos de la transformada de Fourier de  $f(x)$  y de sus respectivas derivadas. Si desarrollamos explícitamente el módulo al cuadrado de  $f(x)$  y sustituimos la función  $f^*(x)$  por la expresión dada al hacer el complejo conjugado de la Ec. (4.3), obtenemos

$$\langle x^n \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} x^n f(x) f^*(x) dx = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} x^n f(x) F^*(u) e^{-i2\pi ux} du dx. \quad (45)$$

A partir de la Ec. (4.2) es trivial deducir la expresión

$$\frac{d^n F(u)}{du^n} = \int_{-\infty}^{\infty} (-i2\pi x)^n f(x) e^{-i2\pi ux} dx, \quad (46)$$

que permite expresar el momento  $n$ -ésimo de la Ec. (4.5) como [Cohen 1995]

$$\langle x^n \rangle = \frac{1}{(-i2\pi)^n} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d^n F(u)}{du^n} F^*(u) du. \quad (4.7)$$

De igual forma que hemos definido los momentos de orden  $n$  en el espacio de posiciones mediante la Ec. (4.4), podemos hacerlo para el espacio recíproco, de manera que

$$\langle u^n \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} u^n |F(u)|^2 du. \quad (4.8)$$

Actuando de modo análogo al análisis en el dominio espacial, podemos obtener estos momentos a partir de la expresión [Cohen 1995]

$$\langle u^n \rangle = \frac{1}{(i2\pi)^n} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d^n f(x)}{dx^n} f^*(x) dx. \quad (4.9)$$

Por último, recordamos la definición de varianza

$$\sigma_x^2 = \frac{\langle x^2 \rangle}{\langle x^0 \rangle} - \frac{\langle x^1 \rangle^2}{\langle x^0 \rangle^2}, \quad (4.10)$$

que es el momento de segundo orden normalizado referido al centroide o centro de gravedad (momento de primer orden normalizado). Éste será un parámetro clave a lo largo de este trabajo. A la raíz cuadrada de la varianza

a menudo se le llama desviación estándar de  $f(x)$ , y se suele considerar como una medida de la anchura de dicha función.

De modo análogo, la varianza en el espacio de frecuencias se define mediante la expresión

$$\sigma_u^2 = \frac{\langle u^2 \rangle}{\langle u^0 \rangle} - \frac{\langle u^1 \rangle^2}{\langle u^0 \rangle^2}. \quad (4.11)$$

Nótese que a pesar de que hemos impuesto la condición de continuidad y derivabilidad en todo su dominio a la función  $f(x)$ , es posible extender las definiciones anteriores al caso de funciones continuas no derivables haciendo uso de las propiedades de la función generalizada  $\delta$  de Dirac.

#### 4.1.2. Transformación de momentos espectrales frente a variaciones de fase

Consideremos ahora que a una cierta función  $f(x;0)$  se le aplica una variación de fase como la indicada en la Ec. (4.1), de modo que queda transformada en la función  $f(x;z)$ . Suponiendo que la función  $\beta(x)$  puede desarrollarse en serie de McLaurin, podemos expresar

$$\beta(x) = \beta(0) + \beta_1 x + \frac{1}{2} \beta_2 x^2 + \dots, \quad (4.12)$$

siendo  $\beta_n = d\beta/dx|_{x=0}$ . Aunque muchos de los resultados que presentamos son válidos para funciones  $\beta(x)$  generales, por sencillez, y por ajus-

tarnos al tipo de variaciones obtenidas en el capítulo anterior, nos centramos en funciones para las que el desarrollo presentado en la Ec. (4.12) se extiende sólo hasta segundo orden. Por otro lado, sabemos que el primer término del desarrollo nos proporciona una constante global mientras que el segundo genera un simple desplazamiento del espectro de la función  $f(x;0)$ . Para el análisis que nos interesa estos coeficientes son, por tanto, irrelevantes y, sin pérdida de generalidad, consideramos

$$\beta(0) = \beta_1 = 0, \quad (4.13)$$

o lo que es lo mismo

$$\beta(x) = \frac{1}{2} \beta_2 x^2. \quad (4.14)$$

El propósito de este apartado es hallar la ecuación de propagación, con respecto al parámetro  $z$ , de los momentos hasta segundo orden tanto en el dominio espacial como en el espectral. En primer lugar, para este tipo de variaciones de fase sobre la función  $f(x;0)$  es directo deducir que

$$\langle x^n \rangle_z = \langle x^n \rangle_0, \quad \forall n \in \mathbb{N}, \quad (4.15)$$

donde  $\langle x^n \rangle_z$  representa el momento de orden  $n$  de la función  $f(x;z)$ . Por otro lado, en el dominio frecuencial hacemos uso de la Ec. (4.9) teniendo en cuenta las Ecs. (4.1), (4.4) y (4.14). En primer lugar, calculamos la evolución del momento de orden cero, es decir, la potencia total en el dominio frecuencial. Aplicando el teorema de Parseval, este parámetro es igual

también a la potencia total de la función  $f(x)$ , que es invariante frente a  $z$ . Así pues,

$$\langle u^0 \rangle_z = \langle x^0 \rangle_z = \langle x^0 \rangle_0 = \langle u^0 \rangle_0. \quad (4.16)$$

donde  $\langle u^n \rangle_z$  representa el momento de orden  $n$  de la función  $F(u; z)$ .

En segundo lugar, calculamos la evolución del momento de primer orden con  $z$ , obteniendo en este caso

$$\begin{aligned} \langle u^1 \rangle_z &= \frac{1}{i2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{df(x; z)}{dx} f^*(x; z) dx = \\ &= \langle u^1 \rangle_0 + \frac{z\beta_2}{2\pi} \langle x^1 \rangle_0, \end{aligned} \quad (4.17)$$

donde podemos observar una dependencia lineal con dicho parámetro. Por último, escribimos explícitamente la dependencia del momento de segundo orden con el parámetro de evolución

$$\begin{aligned} \langle u^2 \rangle_z &= -\frac{1}{4\pi^2} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d^2 f(x; z)}{dx^2} f^*(x; z) dx = \\ &= \langle u^2 \rangle_0 - \frac{iz\beta_2}{2\pi^2} \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x; 0)}{dx} f^*(x; 0) dx - \\ &\quad - \frac{iz\beta_2}{4\pi^2} \langle x^0 \rangle_0 + \frac{z^2\beta_2^2}{4\pi^2} \langle x^2 \rangle_0, \end{aligned} \quad (4.18)$$

donde vemos que se obtiene una variación cuadrática con el mismo. Es directo intuir, a partir de la Ec. (4.9), que  $\langle u^n \rangle_z$  es un polinomio de orden  $n$  con  $z$ , ya que  $d^n f(x; z)/dx^n$  también lo es.

Recopilando los resultados obtenidos en esta sección tenemos

$$\begin{aligned}
 \langle u^0 \rangle_z &= \langle u^0 \rangle_0 \\
 \langle u^1 \rangle_z &= \langle u^1 \rangle_0 + \frac{\beta_2}{2\pi} \langle x^1 \rangle_0 z \\
 \langle u^2 \rangle_z &= \langle u^2 \rangle_0 - \frac{i\beta_2}{2\pi^2} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx + \frac{1}{2} \langle x^0 \rangle_0 \right] z + \\
 &\quad + \frac{\beta_2^2}{4\pi^2} \langle x^2 \rangle_0 z^2 \\
 \langle x^n \rangle_z &= \langle x^n \rangle_0, \forall n \in \mathbb{N}.
 \end{aligned} \tag{4.19}$$

#### 4.1.3. Transformación de la varianza espectral

A continuación, y basándonos en el cálculo realizado en el apartado anterior, vamos a proceder a realizar un análisis de la varianza espectral, definida mediante la Ec. (4.11), asociada a la función  $f(x; z)$  y su dependencia con el parámetro de propagación  $z$ . Así, es directo obtener

$$\begin{aligned}
 \sigma_u^2(z) &= \frac{\langle u^2 \rangle_z}{\langle u^0 \rangle_z} - \frac{\langle u^1 \rangle_z^2}{\langle u^0 \rangle_z^2} = \sigma_u^2(0) + \frac{\beta_2^2}{4\pi^2} \sigma_x^2(0) z^2 - \\
 &\quad - \left\{ \frac{i\beta_2}{2\pi^2 \langle u^0 \rangle_0} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx + \frac{1}{2} \langle u^0 \rangle_0 \right] + \frac{\beta_2}{\pi \langle u^0 \rangle_0^2} \langle x^1 \rangle_0 \langle u^1 \rangle_0 \right\} z.
 \end{aligned} \tag{4.20}$$

Nótese que en la última expresión se ha aplicado la relación dada por la Ec. (4.16). Por otro lado, la ecuación anterior parece indicar que la varianza de  $f(x; z)$  es una función compleja. Sin embargo, y puesto que la desviación estándar es una función definida real, es necesario que la expresión entre corchetes de la ecuación anterior sea imaginaria pura. De esta forma, y teniendo en cuenta el producto por el número imaginario  $i$  que multiplica a esta expresión, obtenemos una cantidad real. Efectivamente, tal y como se comprueba en el Anexo A (primera parte),

$$\sigma_u^2(z) = \sigma_u^2(0) + \frac{\beta_2^2}{4\pi^2} \sigma_x^2(0) z^2 + \left[ \frac{\beta_2}{2\pi^2 \langle u^0 \rangle_0} \Im \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx \right\} - \frac{\beta_2}{\pi \langle u^0 \rangle_0^2} \langle x^1 \rangle_0 \langle u^1 \rangle_0 \right] z, \quad (4.21)$$

donde  $\Im$  representa la parte imaginaria. Esta expresión nos indica cómo se propaga la desviación estándar asociada a la variable  $u$  en función del parámetro de evolución  $z$ . Como podemos observar, esta función es una parábola cuyo vértice, que corresponde siempre a un mínimo, se halla en

$$\bar{z} = -\frac{B}{2A}, \quad (4.22)$$

siendo

$$A = \frac{\beta_2^2}{4\pi^2}$$

$$B = \frac{\beta_2}{2\pi^2 \langle u^0 \rangle_0} \Im m \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx \right\} - \frac{\beta_2}{\pi \langle u^0 \rangle_0^2} \langle x^1 \rangle_0 \langle u^1 \rangle_0. \quad (4.23)$$

Para finalizar con este apartado, consideremos el caso de que la función  $f(x;0)$  es real. Ahora, el coeficiente  $B$  que aparece multiplicando a  $z$  en la Ec. (4.21), es idénticamente nulo por los razonamientos expuestos en el anexo A (segunda parte). En este caso, la ecuación de propagación de la desviación estándar asociada a la variable  $u$  en función del parámetro de evolución  $z$  para una función real, queda de la forma

$$\sigma_u^2(z) = \sigma_u^2(0) \left( 1 + \frac{\beta_2^2}{4\pi^2} \frac{\sigma_x^2(0)}{\sigma_u^2(0)} z^2 \right). \quad (4.24)$$

Nótese que ahora lo que tenemos es un comportamiento parabólico pero centrado en  $z = 0$ . Ésta será la ecuación relevante para cálculos posteriores.

El análisis realizado aquí ha sido presentado en otros contextos con anterioridad. Así, por ejemplo, en el anexo B se presentan las analogías de este desarrollo con los teoremas de Ehrenfest de la Mecánica Cuántica.

#### 4.2. Funciones con discontinuidades finitas

En apartados anteriores, hemos obtenido una serie de leyes que siguen la propagación de los momentos, tanto en el espacio de posiciones como en el de frecuencias, en función del parámetro de evolución. Todo el

desarrollo se ha llevado a cabo considerando funciones continuas en todo su dominio. En los apartados sucesivos vamos a abordar el mismo cálculo pero con funciones que poseen *transiciones abruptas*, es decir, con discontinuidades finitas.

#### 4.2.1. Presentación del problema

En muchas ocasiones es necesario hallar parámetros característicos de una determinada función o campo empleando el formalismo de los momentos desarrollado anteriormente. Sin embargo, este procedimiento analítico no es factible cuando consideramos que la función a analizar presenta *fronteras abruptas*. Supongamos una función  $f(x)$  de soporte compacto definido en el intervalo  $[-D, D]$ , continua salvo discontinuidades finitas en los extremos de dicho intervalo. Es directo concluir que la función es necesariamente de módulo integrable en todo  $\mathbb{R}$ . Si tratamos de obtener ahora los momentos de esta función en el dominio de frecuencias, nos encontramos con ciertos problemas matemáticos. En particular, cuando intentamos calcular el momento de segundo orden  $\langle u^2 \rangle$  de dicha función obtenemos un resultado infinito. Este hecho puede intuirse teniendo en cuenta que la derivada de  $f(x)$  presentará discontinuidades tipo  $\delta$  de Dirac en los extremos del intervalo  $[-D, D]$ , con área proporcional a la discontinuidad de la función original. La segunda derivada de esta función, que es la que se relaciona con el momento de segundo orden  $\langle u^2 \rangle$  a partir de la aplicación de la Ec. (4.9), presentará por tanto una discontinuidad tipo  $\delta^2$  de Dirac, cuya área es infinita.

Para verlo más claramente, pongamos un ejemplo sencillo. Imaginemos que  $f(x)$  es la función rectángulo y, por tanto,  $F(u)$  se corresponde

con una función seno-cociente. Hallamos el momento de segundo orden,  $\langle u^2 \rangle$ , simplemente aplicando la Ec. (4.8), o lo que es lo mismo, hallar esta integral equivale a calcular el área que existe bajo la curva definida por  $u^2 |F(u)|^2$  en el intervalo  $(-\infty, \infty)$ . Como es trivial darse cuenta, dicha área es infinita ya que la función a integrar es un seno al cuadrado. En apartados sucesivos vamos a ver cómo soslayar este problema.

#### 4.2.2. Formalismo de los momentos de segundo orden generalizados

En este apartado analizamos el problema que se presenta por el hecho de tener funciones de soporte compacto en un cierto intervalo y con discontinuidades finitas en los extremos del mismo mediante el formalismo presentado por Martínez-Herrero y Mejías [1993]. Además, en primer lugar consideramos que las funciones  $f(x)$  satisfacen  $\langle u^1 \rangle = 0$  y  $\langle x^1 \rangle = 0$ .

El desarrollo matemático que presentamos a continuación puede resumirse cualitativamente de la siguiente forma. El problema que nos encontramos cuando estamos trabajando con funciones con discontinuidades finitas es que el momento de segundo orden  $\langle u^2 \rangle$  diverge, como ya se ha comentado. Para solucionar este problema lo que se plantea es sustituir la integración en toda la recta real en la Ec. (4.9) por una integral cuyos límites se corresponden con el soporte de la función  $f(x)$ . Sin embargo, de esta forma, no tenemos en cuenta la contribución (infinita) de la discontinuidad de esta función. Para solventar este problema, añadimos un sumando finito que trata de acotar la aportación de esta discontinuidad al cálculo del área que hay bajo la curva  $u^2 |F(u)|^2$ . De este modo obtenemos un momento de segundo orden generalizado en el dominio de frecuencias,  $\langle u^2 \rangle_G$ . Nótese que para que este razonamiento sea útil debe permitir com-

para diferentes funciones  $f(x)$  en condiciones equivalentes, con lo que la acotación de la aportación de las discontinuidades tiene que realizarse bajo unas condiciones matemáticas precisas. Adicionalmente, resulta especialmente interesante que estos parámetros generalizados presenten fórmulas de propagación similares a las obtenidas para funciones continuas en las secciones previas.

Basándonos en este razonamiento, proponemos la siguiente definición para los momentos de segundo orden generalizados en el dominio de frecuencias [Martínez-Herrero y Mejías 1993]

$$\langle u^2 \rangle_G = \frac{1}{4\pi^2} \int_{-D}^D \left| \frac{df(x)}{dx} \right|^2 dx + \chi \left( |f(D)|^2 + |f(-D)|^2 \right), \quad (4.25)$$

siendo  $\chi^{-1} = \pi^2 D$  y donde se ha tenido en cuenta el resultado de la Ec. (C.4) del Anexo C. De acuerdo con esta ecuación, queda claro que el primer sumando de la Ec. (4.25) corresponde a la contribución de la zona del soporte donde la función es continua. El segundo sumando, por tanto, pretende dar cuenta de la aportación de las discontinuidades. Para ver el comportamiento de la ecuación anterior, consideraremos algunos ejemplos representativos.

Tomemos, en primer lugar, una función continua en todo su dominio, lo que podemos expresar matemáticamente tomando  $D \rightarrow \infty$ , o bien considerando  $f(D) = 0$ . Es directo comprobar que en este caso el resultado de la Ec. (4.25) coincide con el obtenido a partir de la definición convencional de  $\langle u^2 \rangle$ .

En segundo lugar, consideremos el caso en el que la función  $f(x) = cte \neq 0$  en todo su soporte. Matemáticamente,

$$f(x) = f(D) \operatorname{rect}\left(\frac{x}{2D}\right), \quad (4.26)$$

siendo  $\operatorname{rect}$  la función rectángulo. La transformada de Fourier de esta función se corresponde con

$$F(u) = 2D f(D) \operatorname{sinc}(2Du), \quad (4.27)$$

siendo  $\operatorname{sinc}$  la función seno-cociente. En este caso, el primer término de la Ec. (4.25) se anula y sólo queda la contribución de las discontinuidades de la función  $f(x)$ . Para evaluar con detalle esta aportación, calculemos el momento de segundo orden generalizado  $\langle u^2 \rangle_G$ ,

$$\langle u^2 \rangle_G = \frac{2|f(D)|^2}{\pi^2 D}. \quad (4.28)$$

Recordemos que este valor trata de acotar el área que hay bajo la curva  $u^2 |F(u)|^2$  en toda la recta real. El valor finito así estimado puede asociarse a un límite finito de la integración de dicha curva. Efectivamente, en este caso, si integramos sólo entre los ceros de orden  $m$  de la función  $|F(u)|^2$  obtenemos

$$\int_{-m/2D}^{m/2D} u^2 |F(u)|^2 du = \frac{m|f(D)|^2}{2\pi^2 D}, \quad (4.29)$$



de modo que tomando  $m = 4$  se recupera el valor dado en la Ec. (4.28). En resumen, en este caso particular el valor dado por la Ec. (4.25) equivale a integrar la función  $u^2 |F(u)|^2$  entre los ceros de orden  $-4$  y  $4$  de  $|F(u)|^2$ . En esta región se encuentra contenida más del 75% del área total de esta última función. Nótese que este razonamiento puede extenderse a cualquier  $f(x)$ . Basta igualar el resultado dado por la Ec. (4.25) y la integral definida de la función  $u^2 |F(u)|^2$  entre unos límites, que en general, dependerán de la función concreta considerada. Así, podremos expresar

$$\int_{-\alpha_f}^{\alpha_f} u^2 |F(u)|^2 du = \frac{1}{4\pi^2} \int_{-D}^D \left| \frac{df(x)}{dx} \right|^2 dx + \chi \left( |f(D)|^2 + |f(-D)|^2 \right). \quad (4.30)$$

Aunque, como ya hemos dicho, el valor de  $\alpha_f$  depende de la función considerada, es posible probar que con la definición dada en la Ec. (4.25) se integra  $u^2 |F(u)|^2$  en un intervalo que incluye al menos el 75% de la potencia espectral  $|F(u)|^2$  [Martínez-Herrero y Mejías 1993].

En definitiva, el formalismo de los momentos de segundo orden generalizado propone el siguiente par de ecuaciones, a partir de los cuales, dichos momentos pueden ser calculados, en sentido generalizado,

$$\begin{aligned} \sigma_x^2 &= \frac{\langle x^2 \rangle}{\langle x^0 \rangle} = \frac{1}{\langle x^0 \rangle} \int_{-D}^D |f(x)|^2 dx, \\ \sigma_{u,G}^2 &= \frac{\langle u^2 \rangle_G}{\langle u^0 \rangle} = \frac{1}{4\pi^2 \langle u^0 \rangle} \int_{-D}^D |f'(x)|^2 dx + \\ &\quad + \frac{1}{\pi^2 D \langle u^0 \rangle} \left( |f(D)|^2 + |f(-D)|^2 \right). \end{aligned} \quad (4.31)$$

Finalmente, es posible extender este procedimiento para el caso de funciones, de nuevo con discontinuidades finitas, pero que no están necesariamente *centradas* y son complejas, en general. Es decir, para el caso en el que  $\langle u^1 \rangle, \langle x^1 \rangle \neq 0$ . Para obtener el resultado equivalente a la Ec. (4.25) para estas funciones, definimos una función auxiliar  $\hat{f}(x)$ , en términos de la función  $f(x)$  como

$$\hat{f}(x) = f\left(x + \frac{\langle x^1 \rangle}{\langle x^0 \rangle}\right) \exp\left(-i2\pi x \frac{\langle u^1 \rangle}{\langle u^0 \rangle}\right), \quad (4.32)$$

que cumple trivialmente las condiciones de aplicación requeridas. Además, es directo comprobar que  $\sigma_{u,G}^2$  representa la varianza espectral generalizada tanto para  $f(x)$  como para  $\hat{f}(x)$ . Así, aplicando el resultado dado en la Ec. (4.25), obtenemos

$$\begin{aligned} \sigma_{u,G}^2 &= \frac{1}{4\pi^2 \langle u^0 \rangle} \int_{-D \frac{\langle x^1 \rangle}{\langle x^0 \rangle}}^{D \frac{\langle x^1 \rangle}{\langle x^0 \rangle}} \left| \frac{d\hat{f}(x)}{dx} \right|^2 dx + \frac{1}{\pi^2 D \langle u^0 \rangle} \left( |f(D)|^2 + |f(-D)|^2 \right) = \\ &= \frac{1}{4\pi^2 \langle u^0 \rangle} \int_{-D}^D \left| \frac{df(x)}{dx} \right|^2 dx + \frac{1}{\pi^2 D \langle u^0 \rangle} \left( |f(D)|^2 + |f(-D)|^2 \right) + \\ &+ \left\{ \frac{\langle u^1 \rangle^2}{\langle u^0 \rangle^2} - \frac{\langle u^1 \rangle}{\pi \langle u^0 \rangle^2} \Im \int_{-D}^D \frac{df(x)}{dx} f^*(x) dx \right\}. \end{aligned} \quad (4.33)$$

Es fácil comprobar que si la función  $f(x)$  es real, todos los términos incluidos entre llaves en la expresión anterior se anulan y recuperamos la Ec. (4.31).

En apartados posteriores vemos cómo se propagan estas cantidades con respecto al parámetro de evolución  $z$ .

#### 4.2.3. Transformación de momentos y varianza espectrales

A continuación discutimos las leyes que rigen la propagación de las funciones que poseen *bordes abruptos*, analizando los cambios que sufren las Ecs. (4.19) y (4.24) bajo estas condiciones.

El análisis general de las leyes de propagación a través de sistemas ópticos lineales con el formalismo descrito anteriormente demuestra que se siguen satisfaciendo las mismas ecuaciones para los parámetros generalizados que para el caso de funciones continuas [Lü y Luo 2000; Martínez-Herrero *et al.* 1995a]. Nosotros obtenemos explícitamente este resultado para el caso de variaciones de fase como las que nos ocupan en este capítulo. Como ya se ha discutido varias veces, el único problema se encuentra en el momento de segundo orden  $\langle u^2 \rangle$ , por tanto, sólo tenemos que demostrar que se sigue satisfaciendo la ley de propagación para éste. En una posición  $z$  cualquiera, dicho parámetro se expresa, teniendo en cuenta la Ec. (4.25), como

$$\langle u^2 \rangle_{G,z} = \frac{1}{4\pi^2} \int_{-D}^D \left| \frac{df(x;z)}{dx} \right|^2 dx + \chi \left( |f(D;0)|^2 + |f(-D;0)|^2 \right), \quad (4.34)$$

donde se ha tenido en cuenta la trivialidad  $|f(x; z)| = |f(x; 0)|$ . Desarrollando la derivada que tenemos en la integral anterior podemos escribir

$$\begin{aligned} \langle u^2 \rangle_{G,z} &= \frac{1}{4\pi^2} \int_{-D}^D \left| \frac{df(x;0)}{dx} \right| dx + \chi \left( |f(D)|^2 + |f(-D)|^2 \right) + \\ &+ \frac{\beta_2 z}{2\pi^2} \Im m \int_{-D}^D x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx + \frac{\beta_2^2 z^2}{4\pi^2} \int_{-D}^D x^2 |f(x;0)|^2 dx = (4.35) \\ &= \langle u^2 \rangle_{G,0} + \frac{\beta_2 z}{2\pi^2} \Im m \int_{-D}^D x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx + \frac{\beta_2^2 z^2}{4\pi^2} \langle x^2 \rangle_0, \end{aligned}$$

donde  $\langle u^2 \rangle_{G,0}$  viene dado por la Ec. (4.25). Teniendo presente el anexo A (primera parte), la expresión anterior es similar a la deducida para funciones continuas (Ec. (4.20)). Por tanto, como las leyes de propagación para los momentos no se ven afectadas, es decir, se siguen satisfaciendo aunque las funciones posean discontinuidades, las leyes de propagación para el factor  $\sigma^2$  se corresponde de nuevo con las obtenidas anteriormente. Así, podemos expresar en este caso que

$$\begin{aligned} \sigma_{u,G}^2(z) &= \sigma_{u,G}^2(0) + \frac{\beta_2^2}{4\pi^2} \sigma_x^2(0) z^2 + \\ &+ \left[ \frac{\beta_2}{2\pi^2 \langle u^0 \rangle_0} \Im m \left\{ \int_{-D}^D x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx \right\} - \frac{\beta_2}{\pi \langle u^0 \rangle_0^2} \langle x^1 \rangle_0 \langle u^1 \rangle_0 \right] z. \end{aligned} \quad (4.36)$$

En definitiva, si nuestras funciones poseen discontinuidades finitas, todos los cálculos referidos a la propagación de momentos pueden desarrollarse de forma equivalente a como se realiza para el caso de funciones

continuas, teniendo en cuenta que lo único que cambia es la forma de calcular el momento de segundo orden  $\langle u^2 \rangle$ , que puede hallarse mediante la Ec. (4.25).

#### 4.3. Analogía formal: $\sigma_x^2(z)$ y $\sigma_{z_N}^2(w_{40})$ .

En este apartado, intentamos encontrar las similitudes entre los cálculos desarrollados en las secciones anteriores para las variables estadísticas y la situación óptica descrita en la Fig. 3.1. Dicha analogía es empleada para obtener las ecuaciones que indican cómo se transforman los momentos de la distribución de irradiancia axial frente a la aberración esférica.

La analogía buscada se obtiene realizando en las ecuaciones de partida de este capítulo las siguientes identificaciones

$$\begin{aligned}
 x &\rightarrow \xi \\
 (-D, D) &\rightarrow (-0.5, 0.5) \\
 f(x; 0) &\rightarrow q(\xi) \\
 \beta_2 z &\rightarrow 4\pi w_{40} \\
 f(x; z) &\rightarrow q(\xi; w_{40}) = q(\xi) \exp(i2\pi w_{40} \xi^2) \\
 u &\rightarrow z'_N = z_N - w_{40} \\
 F(u; z) &\rightarrow h(0, z_N; w_{40}).
 \end{aligned} \tag{4.37}$$

Así, obtenemos la evolución de la desviación estándar asociada a la distribución de intensidad axial en función de la aberración esférica, según la definición

$$\sigma_{z_N}^2(w_{40}) = \frac{\langle z_N^2 \rangle_{w_{40}}}{\langle z_N^0 \rangle_{w_{40}}} - \frac{\langle z_N \rangle_{w_{40}}^2}{\langle z_N^0 \rangle_{w_{40}}^2}, \quad (4.38)$$

a través de la expresión

$$\sigma_{z_N}^2(w_{40}) = \sigma_{z_N}^2(0) + 4\sigma_{\xi}^2(0)w_{40}^2 + \left[ \frac{2}{\pi \langle z_N^0 \rangle_0} \Im m \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \xi \frac{dq(\xi)}{d\xi} q^*(\xi) d\xi \right\} - \frac{4}{\langle z_N^0 \rangle_0^2} \langle \xi^1 \rangle_0 \langle z_N^1 \rangle_0 \right] w_{40}. \quad (4.39)$$

Para concluir, nótese que, en el caso de que  $q(\xi)$  pertenezca al conjunto de funciones con discontinuidades finitas, que es lo más habitual, las leyes de propagación se aplican de igual manera, con la salvedad de que el momento de segundo orden,  $\langle z_N^2 \rangle$ , debe calcularse mediante el formalismo de los momentos de segundo orden generalizados. Así, en este caso

$$\sigma_{z_N,G}^2(w_{40}) = \sigma_{z_N,G}^2(0) + 4\sigma_{\xi}^2(0)w_{40}^2 + \left[ \frac{2}{\pi \langle z_N^0 \rangle_0} \Im m \left\{ \int_{-D}^D \xi \frac{dq(\xi)}{d\xi} q^*(\xi) d\xi \right\} - \frac{4}{\langle z_N^0 \rangle_0^2} \langle \xi^1 \rangle_0 \langle z_N^1 \rangle_0 \right] w_{40}, \quad (4.40)$$

donde

$$\begin{aligned} \sigma_{z_N, G}^2(0) = & \frac{1}{4\pi^2 \langle z_N^0 \rangle} \int_{-D}^D \left| \frac{dq(\xi)}{d\xi} \right|^2 d\xi + \frac{1}{\pi^2 D \langle z_N^0 \rangle} \left( |q(D)|^2 + |q(-D)|^2 \right) + \\ & + \left\{ \frac{\langle z_N^1 \rangle^2}{\langle z_N^0 \rangle^2} - \frac{\langle z_N^1 \rangle}{\pi \langle z_N^0 \rangle^2} \Im m \int_{-D}^D \frac{dq(\xi)}{d\xi} q^*(\xi) d\xi \right\}. \end{aligned} \quad (4.41)$$

En nuestro caso consideramos únicamente funciones de apodización  $q(\xi)$  reales. Es trivial, entonces, encontrar la expresión que nos proporciona la evolución de la varianza de la distribución de intensidad axial,

$$\sigma_{z_N, G}^2(w_{40}) = \sigma_{z_N, G}^2(0) \left( 1 + 4 \frac{\sigma_\xi^2(0)}{\sigma_{z_N, G}^2(0)} w_{40}^2 \right). \quad (4.42)$$

Como ya hemos dicho a lo largo de este trabajo, la varianza es un parámetro que se encuentra directamente relacionado con la anchura de la función, por lo que, estudiando este factor en función de la aberración esférica, podemos ver cómo de robusto es el sistema frente a dichas variaciones. Cuanto más insensible sea, menores cambios presentará la distribución de irradiancia axial frente a variaciones en la aberración esférica. Parece interesante estudiar más a fondo esta relación a través de algún ejemplo. En la Fig. 4.1 puede observarse la evolución parabólica de la varianza de la distribución de intensidad axial para la pareja de filtros parabólicos y el filtro gaussiano invertido analizados en el capítulo anterior, todos ellos en comparación con la pupila circular.

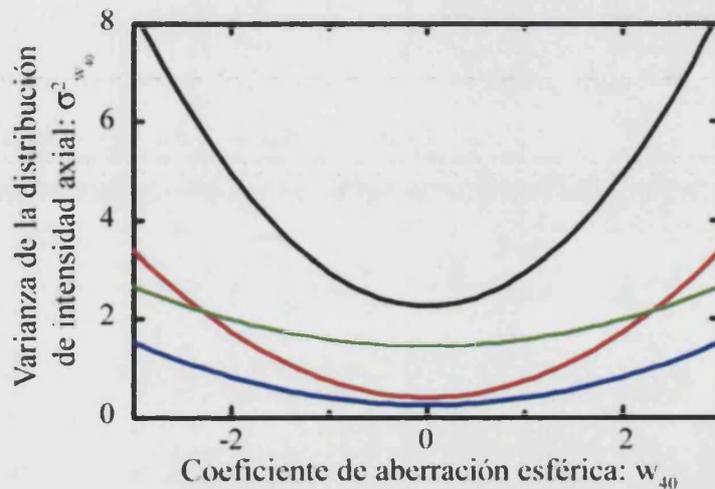


Fig. 4.1. Evolución de la varianza de la distribución de intensidad axial para: (—) pupila circular; (—) filtro de profundidad de campo; (—) filtro superresolvente axialmente; (—) filtro gaussiano invertido.

A la vista de esta última figura no cabe duda de que tenemos cuatro comportamientos diferentes frente a la aberración esférica, ilustrados por los distintos filtros. El filtro cuya versión 1D permitía aumentar la profundidad de campo se muestra muy estable frente a la aberración esférica. Por el contrario, vemos que la varianza equivalente al filtro 1D superresolvente axialmente se modifica enormemente conforme aumenta el coeficiente de aberración esférica  $w_{40}$ . Un comportamiento intermedio entre ambos es el que muestra la pupila gaussiana invertida. En ausencia de aberración esférica, su distribución de intensidad axial es más ancha que la de la pupila circular pero sin embargo, su evolución frente a incrementos de estas distorsiones de fase es muy estable, sin variar apenas su valor. Todo este análisis está en absoluta concordancia con los resultados experimentales mostrados para dichos filtros en el capítulo anterior.

Nuestro principal interés en el próximo capítulo será proponer pupilas apodizantes que hagan el sistema óptico más tolerante frente a la aberración esférica. Para ello, estudiaremos la rapidez de la evolución de la varianza de la distribución de intensidad axial en términos del valor de dicha aberración.

## Capítulo 5

### Técnicas de conformado para incrementar la tolerancia a la aberración esférica

Para diseñar filtros que modifiquen la respuesta axial de un sistema focalizador tenemos que fijarnos en las propiedades de la transformada de Fourier y aplicarlas a la versión proyectada de la función pupila,  $q(\xi)$ . Por consiguiente, resulta conveniente realizar el diseño de nuevos elementos apodizadores sobre la función pupila proyectada.

En capítulos anteriores hemos estudiado el comportamiento, frente a la aberración esférica, de algunos filtros de amplitud, llegando a la conclusión de que, la mayoría de ellos, presentan una gran tolerancia a la misma. Sin embargo, el diseño práctico de este tipo de filtros, en los que la transmitancia varía de forma monótona con la coordenada radial, es muy difícil de realizar.

A lo largo de este capítulo proponemos como elemento apodizador un filtro de obturación anular parcialmente absorbente (en inglés *Shaded Ring*, *SR*, *filters*), constituido por tres niveles de gris, realizamos un diseño óptimo del mismo, y estudiamos con detalle su respuesta axial en un sistema de microscopía confocal de barrido.

### 5.1. Diseño de filtros tolerantes a la aberración esférica

En el capítulo anterior obtuvimos una expresión que relacionaba la varianza de la distribución de intensidad axial con la aberración esférica que sufre el sistema. A continuación, recuperamos dicha expresión para el caso de funciones pupilas proyectadas reales y con discontinuidades finitas, de tal forma que

$$\sigma_{z_N,G}^2(w_{40}) = \sigma_{z_N,G}^2(0) + 4\sigma_{\xi}^2(0)w_{40}^2. \quad (5.1)$$

Analizando esta ecuación, se observa que el término  $\sigma_{z_N,G}^2(0)$  determina el ancho efectivo de la distribución de intensidad axial en ausencia de aberración esférica, mientras que, el factor  $\sigma_{\xi}^2(0)$  indica la rapidez con la que dicha varianza se modifica al ir aumentando el coeficiente de aberración inducida. Nuestro objetivo a lo largo de este trabajo es diseñar filtros tolerantes a estas variaciones de fase. Por tanto, el factor relevante para este diseño es la varianza asociada a la función  $q(\xi)$ . En base a este razonamiento, podemos considerar la función de mérito

$$\Gamma_{w_{40}} = \frac{\sigma_{\xi,c}}{\sigma_{\xi,a}}, \quad (5.2)$$

que denominamos tolerancia a la aberración esférica, siendo  $\sigma_{\xi,a}$  la desviación estándar de la pupila  $q(\xi)$  asociada a un sistema apodizado y  $\sigma_{\xi,c}$  el análogo con pupila circular. Así pues, cualquier sistema que proporcione un valor de  $\Gamma_{w_{40}}$  mayor que la unidad presentará una menor sensibilidad a la aberración esférica que el caso sin apodizar.

Para obtener filtros tolerantes a la aberración esférica, consideramos una función pupila proyectada con una desviación estándar menor que la definida por la pupila circular. Así, podríamos tener en cuenta el caso de filtros apodizantes clásicos, tales como los que corresponden a una función  $q(\xi)$  gaussiana o en forma de parábola invertida centrada en el origen. Sin embargo, la construcción precisa de este tipo de filtros, en los que la transmitancia en amplitud varía de forma continua con la coordenada radial, es difícil de realizar. Una alternativa para abordar este problema es recurrir a métodos de binarización, que generan una pupila de transmitancia en amplitud binaria a partir de un filtro que varía de forma continua. La respuesta de ambos filtros debe ser tan parecida como sea posible [Martínez-Corral *et al.* 2001].

Nuestra propuesta es el uso de un filtro de la familia de los denominados filtros de obturación anular parcialmente absorbentes. Este tipo de filtros está constituido por tres regiones anulares con dos valores de transmitancia no nulos alternos, como el presentado en la Fig. 5.1. El parámetro importante en estos filtros es la proporción existente entre el valor máximo de transmitancia y el correspondiente nivel intermedio; por tanto, y sin pérdida de generalidad, consideramos una pupila cuya transmitancia máxima es 1 y la mínima, distinta de cero, corresponde a  $(1-\eta)$ .

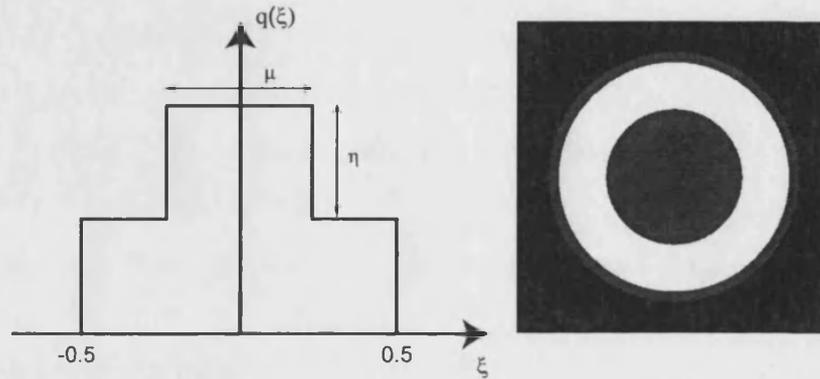


Fig. 5.1. Función pupila proyectada y su transmitancia radial correspondientes a un filtro SR.

Para estos filtros, la tolerancia a la aberración esférica viene dada por

$$\Gamma_{w_{40}}(\mu, \eta) = \sqrt{\frac{12[(1-\eta)^2(1-\mu) + \mu]}{(1-\eta)^2(1-\mu^3) + \mu^3}}, \quad (5.3)$$

y además, presentan valores  $\Gamma_{w_{40}}(\mu, \eta) > 1$ . En consecuencia, son menos sensibles a la aberración esférica que la pupila clara.

Un parámetro a fijar en el diseño de esta familia de filtros es la anchura,  $\sigma_{z_N, G}^2(0)$ , de la distribución de irradiancia axial generada en ausencia de aberración esférica. Resulta interesante diseñar filtros que proporcionen una respuesta de similares características a la proporcionada por la pupila clara en estas circunstancias. Por ello, el valor que fijamos para este parámetro es

$$\sigma_{z_N, G}^{2(a)}(0) = \sigma_{z_N, G}^{2(c)}(0) = \sigma_{z_N}^2 = 0.4. \quad (5.4)$$

Así, partiendo del mismo valor de  $\sigma_{z_N, G}^2(0)$ , el sistema apodizado con  $\Gamma_{w_{40}} > 1$  mantendrá en todo momento una varianza para la distribución de irradiancia axial menor que la proporcionada por la pupila circular para cualquier valor de la aberración esférica.

En el Capítulo 4, analizamos el formalismo de los momentos de segundo orden generalizados. Con este análisis, se presentó un método alternativo para calcular el momento de segundo orden  $\langle z_N^2 \rangle$ , de pupilas  $q(\xi)$  que poseen discontinuidades finitas en los extremos de su soporte. Sin embargo, el filtro propuesto en este apartado posee varias discontinuidades *dentro* de su soporte, lo que nos impide aplicar este formalismo de manera directa. Por ello, recordamos el significado físico de dicho tratamiento. El momento de segundo orden generalizado puede calcularse asociando un límite finito a la integración de la curva  $z_N^2 |I(z_N; w_{40})|^2$ , como se expresa en la Ec. (4.30). Para superar el problema formal con el que nos enfrentamos, teniendo en cuenta que dicho límite depende de la función particular considerada, lo fijamos en los valores correspondientes a la pupila clara, que son  $z_N = \pm 4$ . Estimamos también, que este momento generalizado se transforma del mismo modo que predice la teoría presentada en el capítulo anterior. Aunque no constituye una prueba definitiva, hemos comprobado numéricamente este método alternativo de cálculo en varias funciones que sí cumplen las condiciones analizadas en el Capítulo 4, obteniendo una gran concordancia con los resultados.

Nótese que la Ec. (5.4) nos limita a una familia de filtros *SR* caracterizados por una relación implícita entre los parámetros  $\mu$  y  $\eta$ . Las parejas de valores  $(\mu, \eta)$  de esta familia se representan en la Fig. 5.2

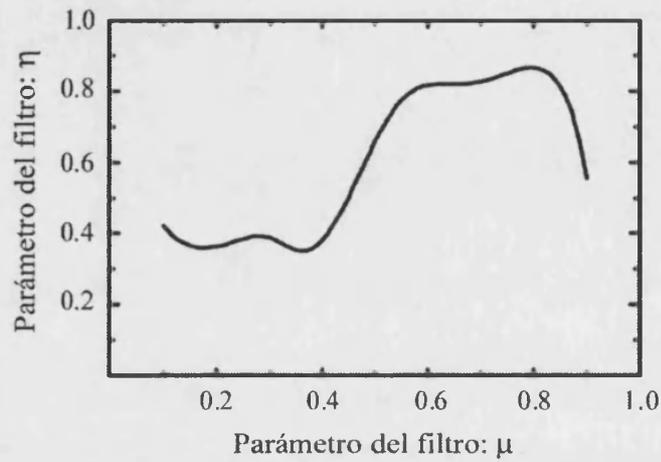


Fig. 5.2. Familia de filtros SR con  $\sigma_{z_N}^2 = 0.4$  .

En la Fig. 5.3 se muestran los valores de la tolerancia a la aberración esférica para esta familia de filtros. El diseño óptimo del sistema lo realizamos, en este caso, escogiendo el filtro que se corresponde con el máximo de dicha curva. Dicho máximo presenta un valor  $\mu = 0.55$  , cuya pareja en la representación de la Fig. 5.2 es  $\eta = 0.77$  .

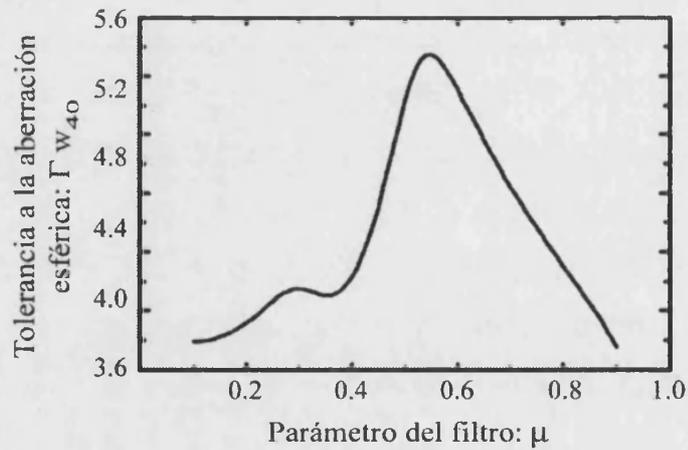


Fig. 5.3. Tolerancia a la aberración esférica para la familia de filtros representada en la Fig. 5.2.

## 5.2. Estudio numérico de la sensibilidad a la aberración esférica del filtro SR

En esta sección realizamos un análisis numérico del comportamiento, frente a variaciones del coeficiente de aberración esférica, del filtro SR diseñado anteriormente. La finalidad de este estudio es comprobar que se satisfacen las condiciones impuestas durante el diseño. En primer lugar, representamos en la Fig. 5.4 la evolución de la varianza de la respuesta axial frente a la aberración esférica, tanto de la pupila circular como la del filtro SR óptimo. El gráfico refleja que, para cualquier valor de aberración, la varianza de la distribución de irradiancia axial del filtro propuesto siempre es inferior a la de la pupila clara, resultado esperado según el análisis de la tolerancia realizado anteriormente. De igual forma podemos estudiar la respuesta axial con diversos valores de aberración esférica, tal y como se muestra en la Fig. 5.5 con un objetivo de  $AN = 1.4$ . Efectivamente, en ausencia de distorsiones del frente de ondas, el filtro propuesto es casi tan bueno como la pupila circular, que sabemos que es, indiscutiblemente, la mejor para este caso. No obstante, conforme aumenta esta aberración, las distribuciones referidas a la pupila clara comienzan a deteriorarse con cierta rapidez, como ya se comentó en el capítulo anterior, mientras que la correspondiente al filtro propuesto lo hace de forma mucho más gradual.

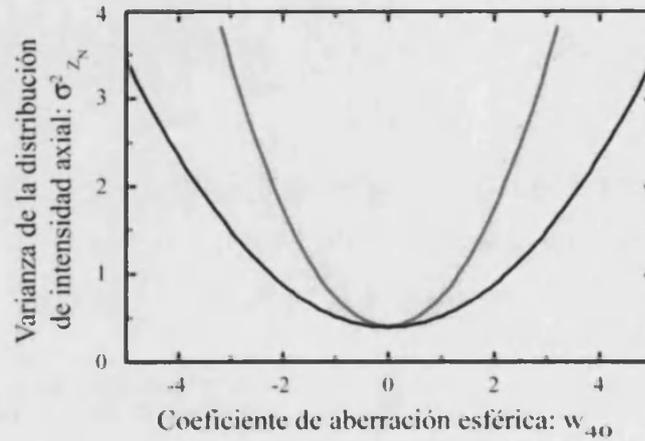


Fig. 5.4. Evolución del momento de segundo orden de la distribución de intensidad axial para pupila circular (—) y filtro SR (—).

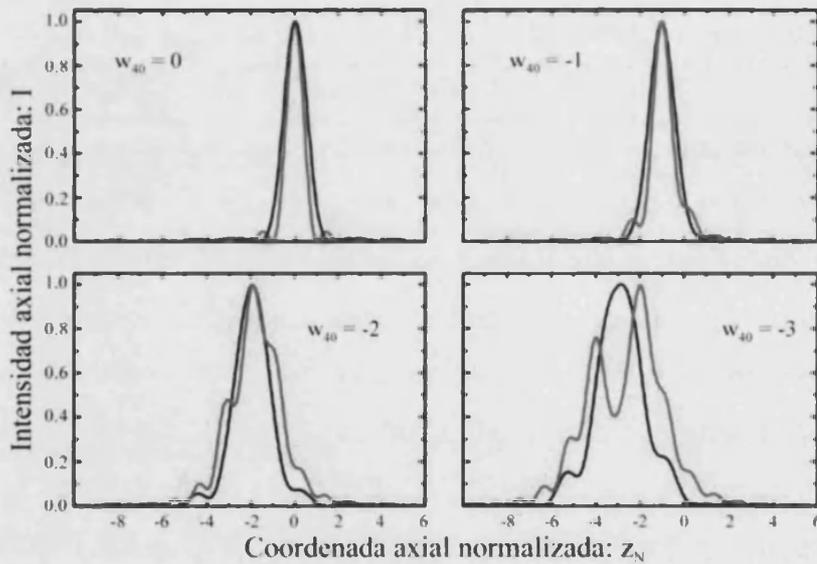


Fig. 5.5. Distribución de intensidad axial con  $w_{40} = 0, -1, -2$  y  $-3$  para pupila circular (—) y filtro SR (—).

Una vez completado el diseño, que se ha efectuado optimizando la respuesta axial del sistema, para demostrar la utilidad práctica de este filtro, en la Fig. 5.6 mostramos el comportamiento transversal en los planos de

mejor foco del sistema formador de imágenes. Como podemos ver, el filtro *SR* mantiene casi inalterada su respuesta transversal frente al incremento de la aberración esférica, al igual que la pupila circular, como ya se analizó en el Capítulo 3.

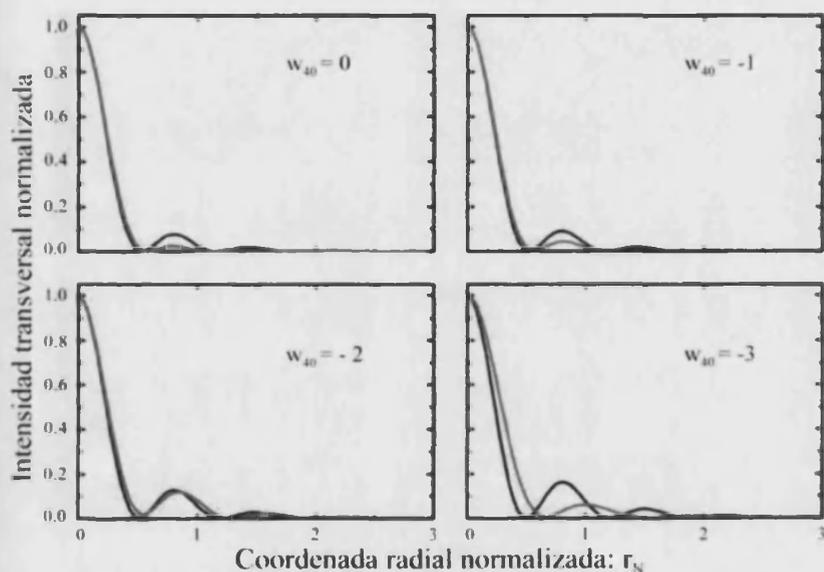


Fig. 5.6. Distribución de intensidad transversal con  $w_{40} = 0, -1, -2$  y  $-3$  en los correspondientes planos de mejor foco para pupila circular (—) y filtro *SR* (---).

Finalmente, otra forma más visual de corroborar este comportamiento es mediante la simulación numérica propuesta en el Capítulo 3, donde se mostraba la imagen de un objeto 3D compuesto por un test radial estándar y un test circular al estilo de una placa zonal de Fresnel, como el representado en la Fig. 3.13. En la Fig. 5.7 se muestra el resultado de dicho cálculo, para el sistema apodizado con el filtro *SR* seleccionado, junto con las imágenes formadas por el sistema con la pupila clara.

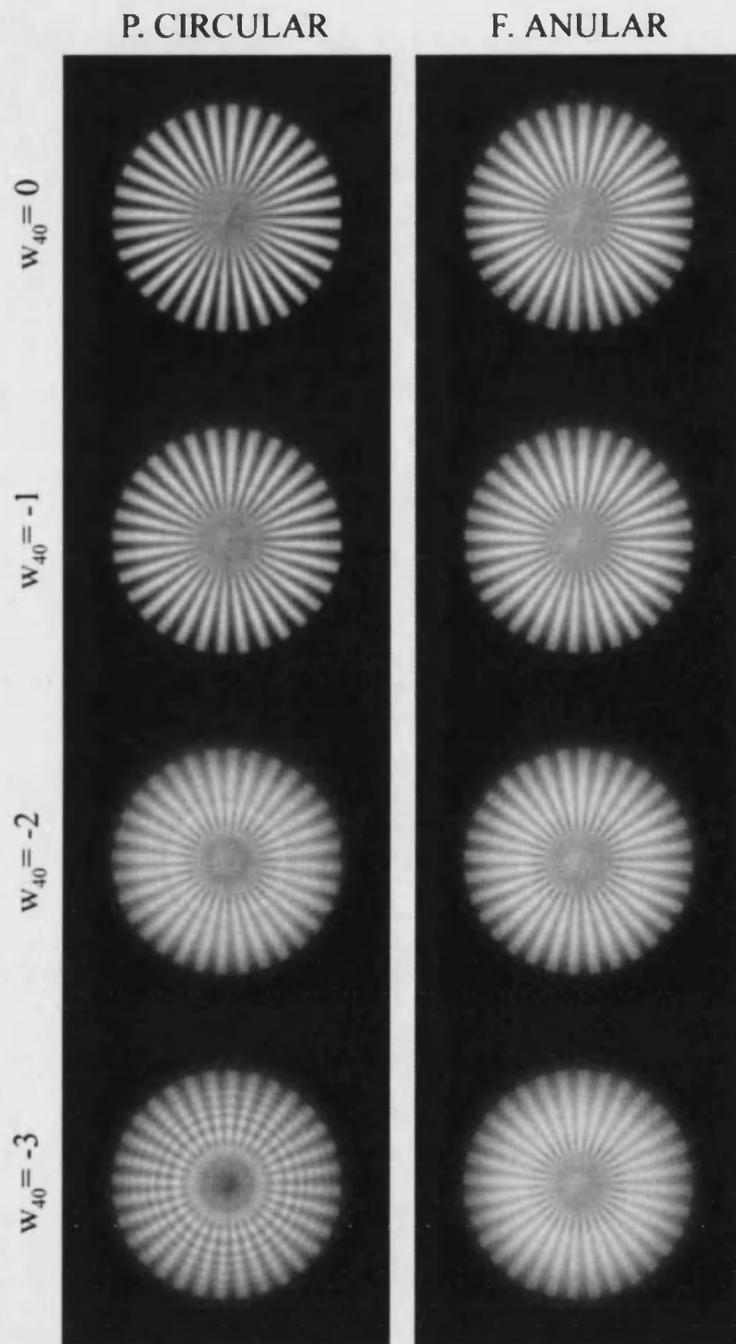


Fig. 5.7. Simulación numérica de formación de imágenes con objeto 3D para la pupila circular y el filtro *SR*.

A la vista de esta figura, ambas pupilas son muy similares para el caso de ausencia de aberración esférica. Sin embargo, la evolución del filtro *SR* frente a ésta es mucho más robusta, como ya habíamos hallado anteriormente.

### **5.3. Verificación de los diseños realizados**

#### **5.3.1 Microscopía confocal de barrido**

Un sistema de microscopía confocal de barrido está constituido, básicamente, por dos subsistemas: el de iluminación y el de detección. El sistema de iluminación focaliza la luz monocromática procedente de una fuente puntual sobre una pequeña región de la muestra. Tras interactuar con ella, la luz que emerge es recogida por el sistema de colección y dirigida hasta un detector puntual situado en el plano conjugado de la fuente. Éste último es, en la práctica, un detector extenso delante del cual se sitúa un estenope. El término confocal hace referencia al hecho de que la fuente de luz, el punto objeto bajo observación y el detector puntual se sitúan en puntos conjugados a través de los sistemas de iluminación y detección. Esta configuración permite recoger un haz de luz cuya intensidad depende directamente de las propiedades de la región de la muestra que está en foco. La imagen 3D se reconstruye en un ordenador con los valores de la intensidad obtenidos tras realizar un barrido tridimensional de la muestra. Los sistemas confocales pueden funcionar en el modo de transmisión, como el representado en la Fig. 5.8, o bien en el modo de reflexión, donde un único objetivo se encarga tanto de focalizar el haz sobre la muestra como de recoger la luz que ha interactuado con ella.

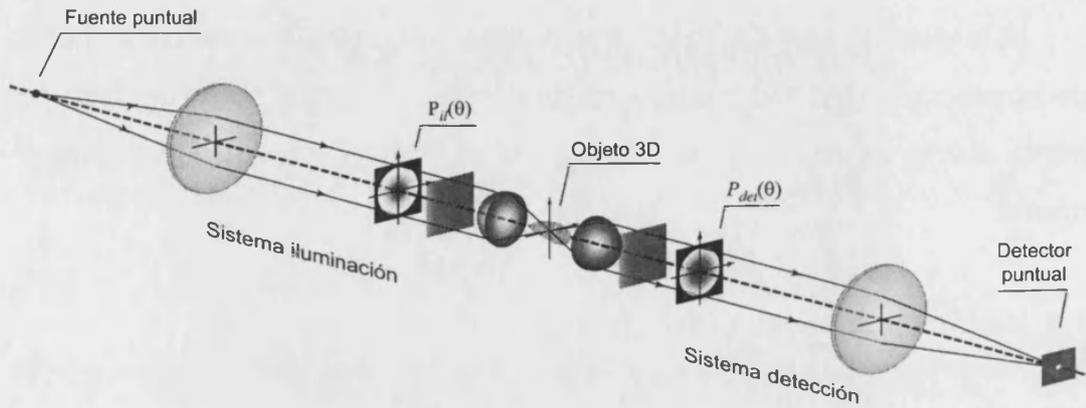


Fig. 5.8. Esquema básico de un sistema de microscopía confocal en modo de transmisión.

Los sistemas confocales de barrido son por naturaleza sistemas 3D LSI ya que el propio proceso de formación de la imagen, mediante el barrido 3D de la muestra, otorga a todos los puntos del objeto la misma respuesta 3D. Esto permite escribir, como en el caso de la microscopía convencional, la distribución 3D de intensidades en el espacio imagen como una convolución 3D

$$I_{conf}(\mathbf{r}, z) = O(\mathbf{r}, z) \otimes_3 PSF_{conf}(\mathbf{r}, z), \quad (5.5)$$

donde la  $PSF$  viene dada ahora por el producto de dos funciones independientes: la  $PSF$  del sistema de iluminación y la del detección. De este modo

$$PSF_{conf}(\mathbf{r}, z) = |h_{il}(\mathbf{r}, z)|^2 |h_{det}(\mathbf{r}, z)|^2, \quad (5.6)$$

donde, si se asume que los subsistemas trabajan con apertura numérica alta,

$$h_l(r, z) = \frac{i2\pi}{\lambda} \int_0^\alpha P_l(\theta) J_0(kr \sin \theta) e^{ikz \cos \theta} \sin \theta d\theta. \quad (5.7)$$

En esta última expresión el subíndice  $l = il$ , *det* hace referencia a los subsistemas de iluminación y detección respectivamente. La expresión de esta función en coordenadas normalizadas se muestra en la Ec. (2.17).

Nótese que, en este tipo de geometría, tanto la parte de iluminación como la de detección son igual de relevantes en las propiedades de la imagen [Sheppard y Choudhury 1977]. Como vemos, cada una de estas respuestas unidad depende explícitamente de su correspondiente función pupila.

La propiedad más relevante de estos sistemas es su capacidad de seccionado óptico [Carlsson *et al.* 1985; Hamilton *et al.* 1981; Wilson 1990]. Con un razonamiento heurístico es fácil entender que la detección puntual es la clave para conseguir esta habilidad. La luz procedente del plano objeto situado en el foco es muy intensa y, además, es posteriormente focalizada sobre el estenope y detectada con una alta eficiencia, como vemos en la Fig. 5.9 (a). Sin embargo, la luz que procede de planos fuera de foco, Fig. 5.9 (b), sufre dos efectos que contribuyen a que la eficiencia en su detección se vea considerablemente atenuada: por un lado es menos intensa que la que emerge del foco y por otro es fuertemente rechazada por el estenope.

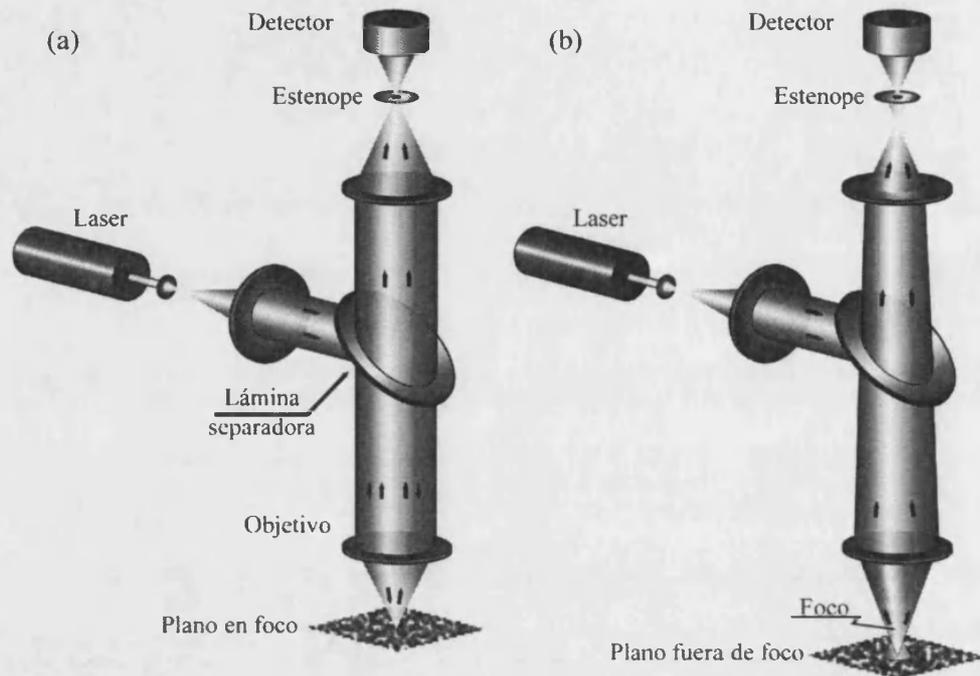


Fig. 5.9. Representación gráfica del efecto del detector puntual sobre la luz procedente de (a) plano en foco y (b) plano fuera de foco.

Por tanto, la microscopía confocal se constituye como una técnica no invasiva que permite observar muestras biológicas gruesas con gran calidad de imagen sin necesidad de seccionarlas físicamente.

### 5.3.2 Descripción del montaje experimental

Para comprobar el comportamiento real del filtro propuesto teóricamente en el apartado anterior, realizamos un experimento con dicho filtro en un sistema de microscopía confocal de barrido. El esquema del dispositivo experimental empleado es el representado en la Fig. 5.10.

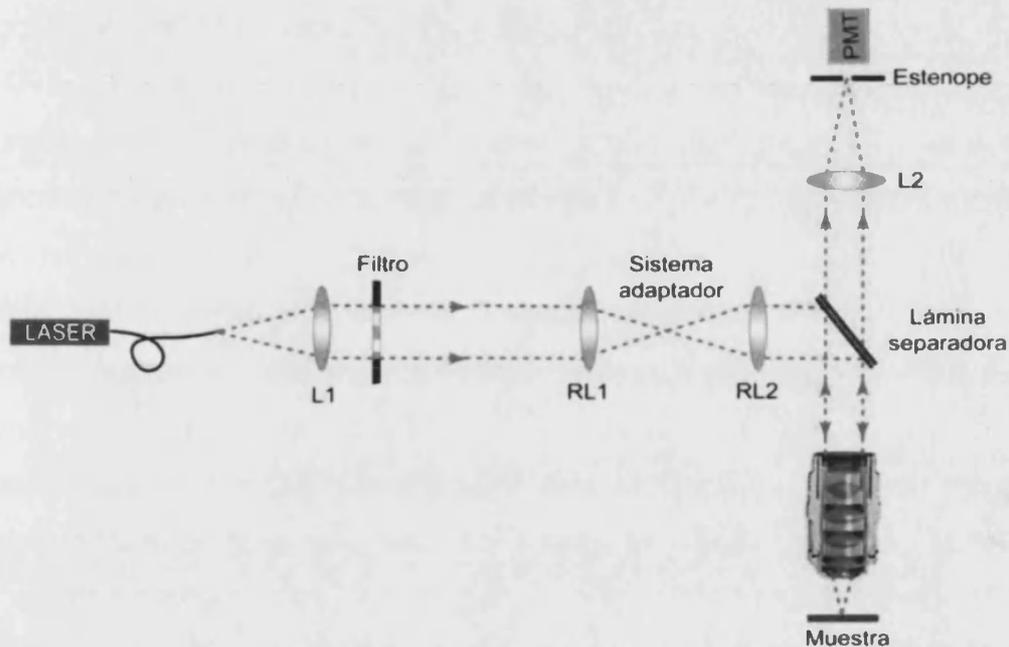


Fig. 5.10. Esquema del sistema confocal empleado.

La luz procedente de una fuente láser de He-Ne, cuya emisión es continua con  $\lambda = 632.8\text{nm}$ , es conducida a través de una fibra monomodo hasta el eje óptico del montaje. La salida del haz en la fibra es considerada como una fuente puntual. Mediante una lente colimadora y con la ayuda de una lámina separadora 50/50, el haz ilumina el objetivo que es, sin duda, el elemento fundamental en un microscopio óptico pues de él depende la calidad de las imágenes que podemos obtener. En nuestro montaje se trata de un objetivo planapocromático (Olympus), lo que significa que el grado de corrección de la aberración esférica y cromática, así como de la curvatura de campo, es muy alto. Dicho objetivo está diseñado específicamente para radiación visible e inmersión en agua. Bajo estas condiciones, la apertura numérica del mismo es 1.2.

Las muestras biológicas que generalmente se estudian en microscopía están cubiertas por un cubreobjetos cuyo espesor oscila entre 100 y 220  $\mu m$ . Para compensar la aberración esférica generada por esta lámina, como ya se comentó en el Capítulo 3, algunos objetivos de microscopio incorporan un anillo de corrección, generalmente denominado *correction collar*, cc, en la literatura anglosajona, que permite reajustar la posición interna de los distintos elementos. La aberración esférica generada por este desplazamiento se suma algebraicamente a la producida por el cubreobjetos, de manera que ambas pueden compensarse. El objetivo que vamos a emplear permite corregir espesores de cubreobjeto comprendidos entre 130 y 210  $\mu m$ . Este anillo de corrección es el que emplearemos para inducir de manera controlada diferentes valores de aberración esférica. Puesto que el objetivo que empleamos está diseñado para corregir la aberración introducida por un cubreobjetos de espesor mínimo 130  $\mu m$  y trabajar en inmersión en agua, es necesario que nuestro objeto se aproxime a estas condiciones de trabajo con el fin de evitar unas distorsiones de fase exageradas. Por ello, empleamos siempre sobre las muestras, un cubreobjetos estándar ( $n^{\circ}1$ , espesor  $\approx 140 \mu m$ ) depositado sobre una gota de agua. También se rellena con agua el espacio comprendido entre el objetivo y el cubreobjetos.

El haz reflejado en la muestra regresa de nuevo por el objetivo y es conducido al detector. En nuestro sistema se trata de un tubo fotomultiplicador (Hamamatsu, R636-10) de área extensa, con ganancia de  $10^6$  para la radiación visible y con un valor muy alto de la relación señal-ruido, rango dinámico y velocidad de respuesta. Para conseguir que la detección sea puntual, y por tanto el sistema funcione en el régimen confocal, situamos

una lente que focaliza el haz sobre un estenope de  $20\mu\text{m}$  de diámetro, el cual se sitúa delante del detector y lo más próximo posible a éste.

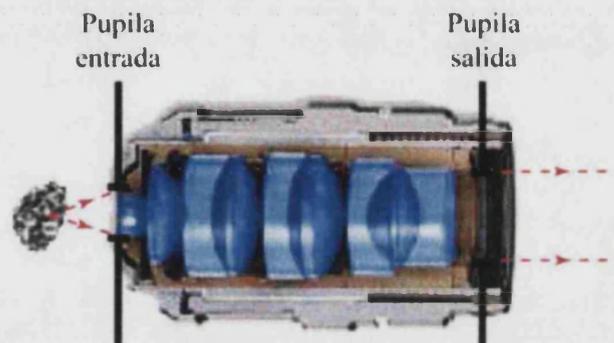


Fig. 5.11. Posición de las pupilas de entrada y salida de un objetivo de microscopio.

En este punto, nos planteamos en qué plano debemos colocar el filtro y cuál es la posición de dicho plano. Puesto que lo que queremos es modificar la función pupila del objetivo de microscopio, resulta evidente que debemos situar el filtro en el plano de la pupila de salida del mismo (según la orientación del objetivo en un microscopio convencional), tal y como muestra la Fig. 5.11. Por otro lado, los objetivos de microscopio de apertura numérica alta se diseñan, generalmente, de manera tal que su pupila de salida se sitúa sobre el plano focal imagen del objetivo [Juskaitis 2003]. Por tanto, éste es el plano cuya posición debemos determinar y donde insertaremos el filtro posteriormente. En el objetivo que nosotros utilizamos, como sucede frecuentemente, el plano focal imagen se encuentra en el interior del mismo, y por ello, no es posible situar el filtro apodizante directamente sobre él. Por consiguiente, empleamos un sistema adaptador que forma la imagen del filtro sobre la pupila de salida del objetivo. Este sistema adaptador, mostrado en la Fig. 5.10, está formado por dos lentes de focales 200 y

175 mm respectivamente, constituyendo un sistema afocal. Este procedimiento que sitúa el filtro sobre el plano de la pupila de salida del objetivo es necesario, aún cuando dicho plano sea accesible, si se quiere que el filtro actúe sólo en la rama de iluminación.

El método experimental que utilizamos para superponer nuestro filtro, en posición y tamaño, a la pupila de salida del objetivo está basado en el esquema de la Fig. 5.12. En primer lugar iluminamos, con una fuente de luz difusa convencional, el objetivo de microscopio, tal y como se muestra en dicha figura, y desplazamos la cámara CCD a lo largo del eje óptico hasta conseguir enfocar la imagen de la pupila del objetivo a través del sistema adaptador. A continuación fijamos la cámara en esa posición e insertamos el filtro. El ajuste 3D del filtro nos permite superponer y centrar su imagen sobre la CCD con la de la pupila del objetivo.

Además, este método permite determinar con exactitud el diámetro que debe tener el filtro, y por tanto, la forma final del mismo. Con estos datos hemos realizado el filtro por métodos fotográficos empleando una película de alto contraste (*Technical Pan*<sup>®</sup>, Kodak). Conviene recordar que estamos interesados en comparar la respuesta del sistema con y sin el filtro SR. Para garantizar que esta comparación se realiza en las mismas condiciones de apertura del objetivo, debemos asegurarnos de que el diámetro de la pupila circular con la que comparamos es exactamente el mismo que el del filtro. Para ello, contrastamos los resultados obtenidos con el sistema con filtro y con una pupila circular del mismo diámetro que éste.

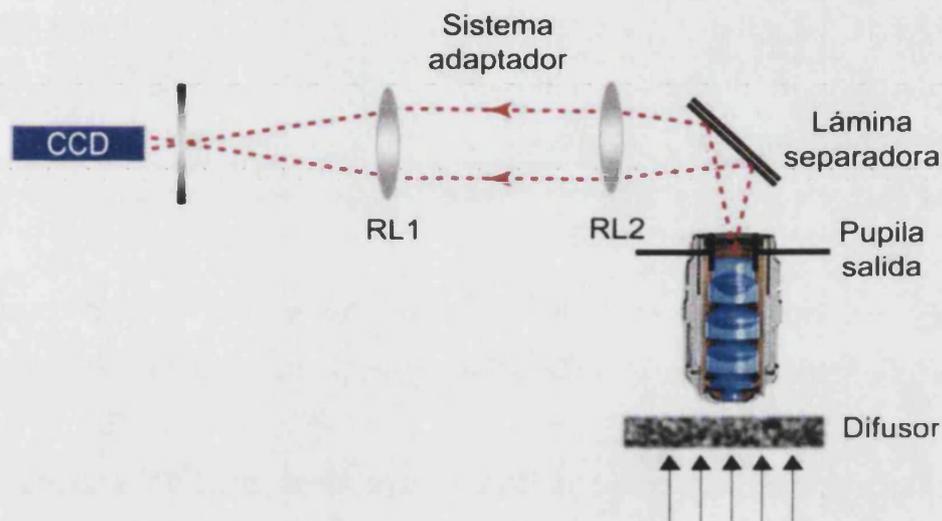


Fig. 5.12. Montaje para proyectar el filtro empleado sobre la pupila de salida del objetivo.

La fuente puntual (salida de la fibra) y el detector están situados en planos conjugados y constituyen un sistema estático. El barrido del objeto se realiza con un desplazador tridimensional piezoeléctrico (Piezosystem Jena). Con el fin de compensar la histéresis que sufren estos sistemas, este desplazador lleva incorporados unos sensores de posición que comunican al controlador sus coordenadas. En este modo de trabajo, denominado *ciclo cerrado*, el recorrido máximo del desplazador es de  $80 \mu m$  en cada dirección, con una precisión muy inferior a  $1 \mu m$ .

Por otro lado, detrás del detector y del desplazador piezoeléctrico existe todo un dispositivo electrónico de adquisición y procesado de la información que se encarga de reconstruir la imagen final. En nuestro sistema la señal recogida por el detector es transmitida a un ordenador personal mediante una tarjeta de adquisición de datos (National Instruments) y procesada con un software especializado (LabView). Este software nos permite

controlar el movimiento del sistema de barrido 3D además de almacenar, en una matriz de datos, los valores de la intensidad recogidos para cada posición de la muestra. Este proceso se realiza de forma sincronizada.

### 5.3.3. Resultados experimentales

En este apartado detallamos los resultados experimentales obtenidos con el montaje descrito anteriormente para caracterizar la respuesta del filtro diseñado frente a variaciones de la aberración esférica. En particular, nos centramos en la caracterización de la respuesta axial del sistema. Para ello, medimos un parámetro relacionado muy estrechamente con esta respuesta y que es fácilmente accesible experimentalmente. Se trata de la llamada respuesta a un reflector plano perfecto o simplemente función  $V$ . Básicamente, debemos obtener los valores de la intensidad detectados a medida que desplazamos axialmente, a través del volumen focal, un espejo plano de alta reflectancia. Este criterio es frecuentemente empleado para valorar la capacidad de formación de imágenes que posee un sistema axialmente [Sheppard 1987] y, además, es sencillo de investigar experimentalmente. Puede probarse que, en estas circunstancias, la intensidad medida sobre el fotodetector [Martínez-Corral *et al.* 1998; Sheppard y Wilson 1981] viene dada por

$$V(z_N; w_{40}) = \left| \int_0^\alpha P_i(\theta) P_c(\theta) \exp[i2\Phi_{AE}(\theta)] \times \right. \\ \left. \times \exp \left[ -i4\pi z_N \frac{\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \right] \sin \theta d\theta \right|^2 \quad (5.8)$$

donde  $z_N$  es la coordenada axial normalizada que define la posición del espejo a través de la Ec. (2.17),  $\alpha$  el máximo ángulo de convergencia de la lente y  $\Phi_{AE}(\theta)$  la aberración del frente de ondas.  $P_{i,c}(\theta)$  representa la función de apodización de la rama de iluminación y colección, respectivamente. Si el sistema satisface la condición del seno, que es la más habitual en microscopía y el caso del sistema experimental empleado, y suponiendo que la aberración del frente de ondas viene dada por la Ec. (3.20), llegamos a la siguiente expresión para la función  $V$

$$V(z_N; w_{40}) = \left| \int_{-0.5}^{0.5} \left[ \cos^2\left(\frac{\alpha}{2}\right) - 2 \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right) \xi \right] q_i(\xi) q_c(\xi) \times \right. \\ \left. \times \exp(i4\pi w_{40} \xi^2) \exp(-i4\pi z'_N \xi) d\xi \right|^2, \quad (5.9)$$

donde se ha tenido en cuenta el cambio de variable representado en la Ec. (3.22)

En la práctica, hemos empleado el sistema descrito anteriormente usando como muestra un espejo dieléctrico que se utiliza para realizar el barrido axial (planitud  $\lambda/10$ ), sobre el que se depositó una gota de agua y un cubreobjetos. Nótese que para obtener la función  $V$  bastaría con tomar la intensidad sobre el detector para cada posición  $z$  del espejo que realiza el muestreo en una posición transversal dada, puesto que cualquier sección axial del espejo es equivalente idealmente. No obstante, puesto que el programa nos permite hacer un barrido 2D con relativa rapidez, tomamos imágenes del mismo barrido axial para diferentes posiciones transversales del espejo. Esto nos permite promediar los valores de la función  $V$  correspondientes al mismo valor de  $z$ . De esta manera, obtenemos el perfil

dientes al mismo valor de  $z$ . De esta manera, obtenemos el perfil axial de dicha función mejorando la relación señal-ruido.

Para introducir valores de aberración esférica en el experimento nos apoyamos en el anillo de corrección del que dispone el objetivo, tal y como comentamos previamente. Si la posición de este anillo es la que genera una compensación precisa de la aberración inducida por el cubreobjetos, el sistema quedará libre de aberración. Sin embargo, para otras posiciones de éste se tendrá una sobre- o sub-compensación que producirá una aberración esférica residual. De esta forma, se obtienen los datos experimentales mostrados en las Figs. 5.13 y 5.14.

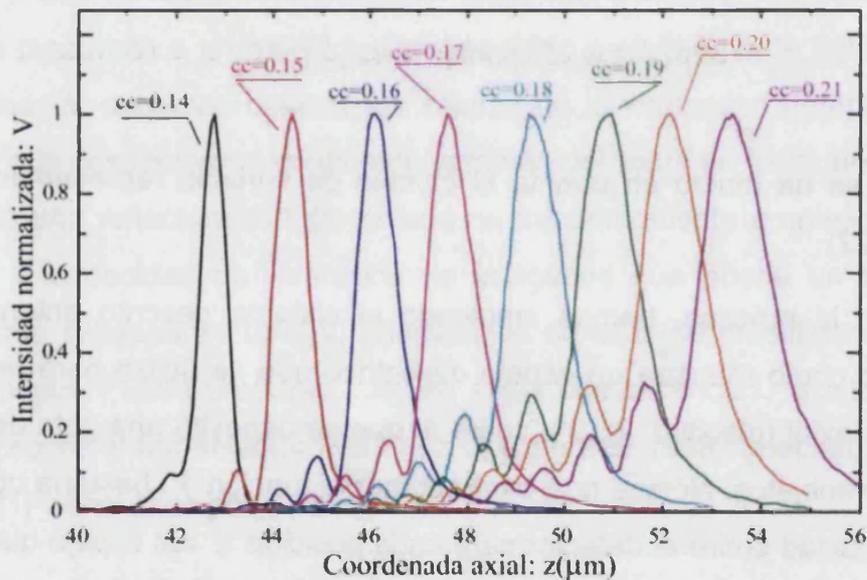


Fig. 5.13. Función  $V(z)$  experimental para la pupila circular y varios ajustes del anillo de corrección. Estos ajustes introducen los siguientes valores del coeficiente de aberración esférica: (—)  $w_{40} = 0$ , (—)  $w_{40} = 0.7$ , (—)  $w_{40} = 1.4$ , (—)  $w_{40} = 2.1$ , (—)  $w_{40} = 2.8$ , (—)  $w_{40} = 3.5$ , (—)  $w_{40} = 4.2$ , (—)  $w_{40} = 4.9$ .

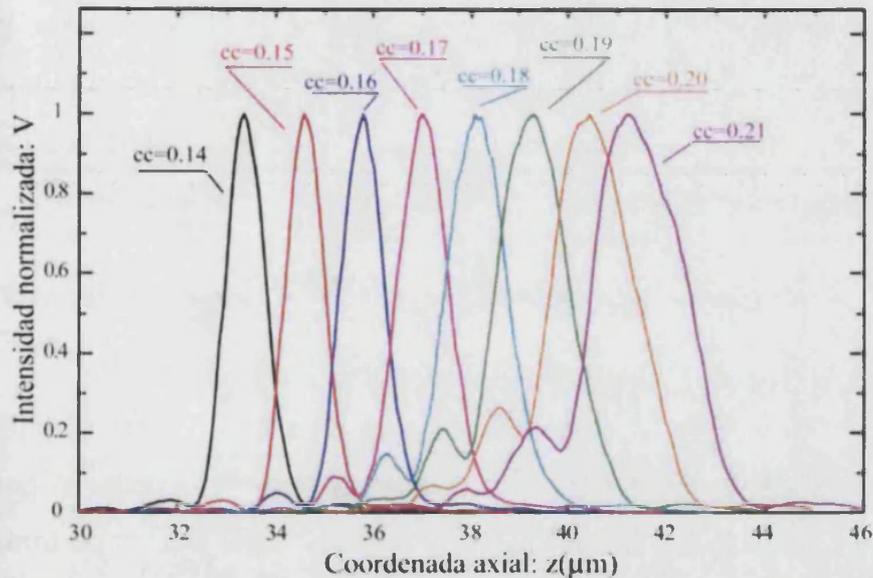


Fig. 5.14. Función  $V(z)$  experimental para el filtro SR y varios ajustes del anillo de corrección. Estos ajustes introducen los siguientes valores del coeficiente de aberración esférica: (—)  $w_{40} = 0$ , (—)  $w_{40} = 0.7$ , (—)  $w_{40} = 1.4$ , (—)  $w_{40} = 2.1$ , (—)  $w_{40} = 2.8$ , (—)  $w_{40} = 3.5$ , (—)  $w_{40} = 4.2$ , (—)  $w_{40} = 4.9$ .

Como podemos observar, a medida que incrementamos la aberración esférica, se produce una mayor asimetría de la respuesta axial del sistema, apareciendo una serie de lóbulos secundarios cada vez más intensos cuando se trata de la pupila circular, mientras que el filtro proporciona una respuesta más robusta frente a estas variaciones. Cabe señalar, a la vista de dichas figuras, que la posición del anillo de compensación para el valor  $0.14 \text{ mm}$  es la que genera una respuesta más simétrica y más estrecha en ambos casos, como corresponde a una compensación casi perfecta de la aberración generada por el espesor del cubreobjetos empleado.

Finalmente, el desplazamiento del máximo de la respuesta axial es menor para el sistema apodizado con nuestro filtro que con la pupila circular, lo que confirma la utilidad de los filtros *SR* en estos sistemas formadores de imágenes.

#### **5.3.4. Procedimiento híbrido para reducir el impacto de la aberración esférica**

Tal y como se ha venido describiendo, el deterioro de la respuesta impulsional que aparece debido a la aberración esférica creciente generada durante el proceso de barrido axial, provoca una pérdida importante en la calidad de las imágenes 3D obtenidas en microscopía. Naturalmente, cuando el microscopio se utiliza para obtener la imagen de una determinada muestra 2D, la aberración esférica generada por el salto de índice de refracción puede compensarse estáticamente ajustando el anillo de corrección. Esto permite la obtención de imágenes 2D de alta calidad, sin necesidad de sistemas adicionales de reducción del impacto de la aberración esférica.

Más aún, incluso en el caso en que el microscopio enfoque a una profundidad diferente de la que se compensó con el anillo de corrección, la imagen 2D sigue siendo de alta calidad. Esto es así porque aunque la aberración esférica generada da lugar a una degradación importante de la respuesta impulsional 3D, la sección lateral de ésta en el plano de mejor imagen sigue siendo muy parecida al disco de Airy. Esto implica que, en términos reales, no es corriente la captura de imágenes 2D cuya calidad se vea afectada seriamente por la aberración esférica.

El problema real surge cuando se trata de obtener imágenes de muestras 3D. También en este caso el anillo de corrección se ajusta para compensar la aberración esférica correspondiente a una cierta profundidad de barrido. Sin embargo, cuando en el proceso de barrido se enfoca a planos situados a diferentes profundidades, la degradación padecida por la respuesta impulsional hace que la imagen se emborrona con la luz procedente de otras secciones de la muestra. Por ello, parece razonable analizar la influencia de la aberración esférica en sistemas especialmente diseñados para la formación de imágenes 3D.

Así pues, el propósito de esta sección es visualizar la influencia de la aberración esférica en un sistema confocal con pupila circular, y comprobar las mejoras alcanzadas haciendo uso de un procedimiento híbrido en que primero se obtiene la imagen 3D insertando un determinado filtro de fase en la pupila del objetivo, y posteriormente se aplican técnicas de desconvolución 3D.

El procedimiento híbrido que proponemos tiene origen en la analogía formal entre la focalización 1D y el comportamiento axial de sistemas con aberración esférica. Esta analogía nos ha permitido aplicar a nuestro problema la técnica denominada como *wavefront coding* [Dowski y Cathey 1995], que ha sido diseñada para incrementar la profundidad de campo de los sistemas formadores de imágenes paraxiales. Esta técnica híbrida combina el uso de un filtro pupilar que, aunque distorsiona en gran medida la componente transversal de la PSF, dota al *spot* focal de un alto grado de invariancia axial. Esta invariancia permite la aplicación de procedimientos de desconvolución a la imagen 3D. Una propuesta satisfactoria en este

sentido es el filtro cúbico de fase 1D propuesto por Cathey y colaboradores [Bradburn *et al.* 1997].

Nuestra propuesta consiste en aplicar la variación cúbica de fase en el espacio adimensional proyectado  $\xi$  (ver Ec. (3.22)). De esta forma diseñamos el filtro radial,

$$q(\xi) = \exp(-i2\pi A\xi^3). \quad (5.10)$$

Siguiendo la sugerencia de los propios Dowsky y Cathey hemos tomado un valor de  $A \gg 5$ . En nuestro caso  $A = 50$ . En la Fig. 5.15 se muestra en una representación de niveles de gris la variación de fase del filtro cúbico, que resulta al aplicar el cambio de variable mostrado en la Ec. (3.22) a dicha función  $q(\xi)$ .

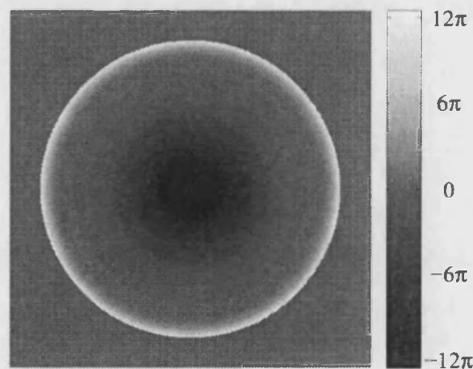


Fig. 5.15. Representación en niveles de gris de la variación de fase del filtro cúbico.

Para comprobar la utilidad del procedimiento híbrido, hemos llevado a cabo una simulación numérica en la que hemos considerado un microscopio confocal equipado con un objetivo de  $AN = 1.4$  de inmersión en aceite

( $n_1 = 1.52$ ). Hemos supuesto que el índice de refracción de la muestra es próximo al de la solución acuosa,  $n_2 = 1.33$ , en la que está sumergida. Por último, con objeto de reproducir una situación realista, hemos supuesto que el anillo de corrección se ajusta para compensar la aberración esférica para un plano situado a una cierta distancia,  $d' = 10\mu\text{m}$ , de la interfaz (ver Fig. 3.2), que corresponde a distancia de focalización de la onda incidente  $d = 11.7\mu\text{m}$ .

En la Fig. 5.16 se muestran las componentes axiales de las respuestas impulsionales confocales focalizadas sobre el plano  $d' = 10\mu\text{m}$  y sobre otros 6 planos equidistantes.

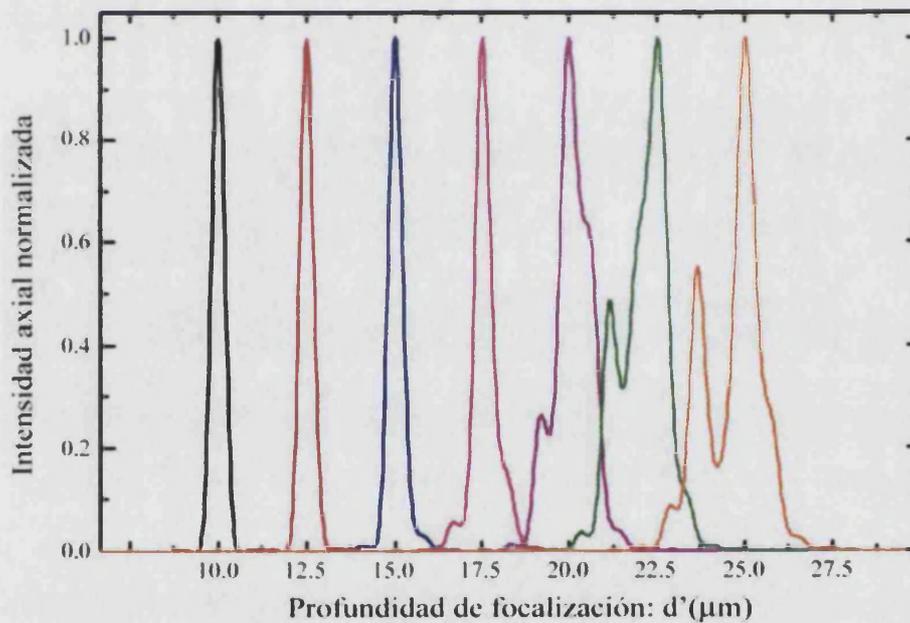


Fig. 5.16. Sección axial de las respuestas impulsionales confocales focalizadas sobre  $d' = 10\mu\text{m}$  y otros 6 planos equidistantes.

A continuación, en la Tabla 5.1 se muestran los valores de  $d$ ,  $d'$  y del correspondiente coeficiente de aberración esférica.

$d'(\mu m)$	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0
$d(\mu m)$	11.7	15.0	18.3	21.6	24.9	27.5	30.8
$w_{40}$	0.0	-0.5	-1.0	-1.6	-2.1	-2.5	-3.0

Tabla 5.1. Valor de la distancia de focalización de la onda incidente,  $d$ , y del coeficiente  $w_{40}$  correspondientes a siete valores de  $d'$ .

Para nuestra simulación utilizamos un objeto 3D sintético compuesto por una serie de 8 pantallas planas equidistantes situadas en las posiciones  $d' = 17.5\mu m + i\Delta$ , con  $i = 0, \dots, 7$  y  $\Delta = 1.25\mu m$ . La serie de 8 pantallas estaba compuesta por la repetición en cascada de la serie que se muestra en la Fig. 5.17

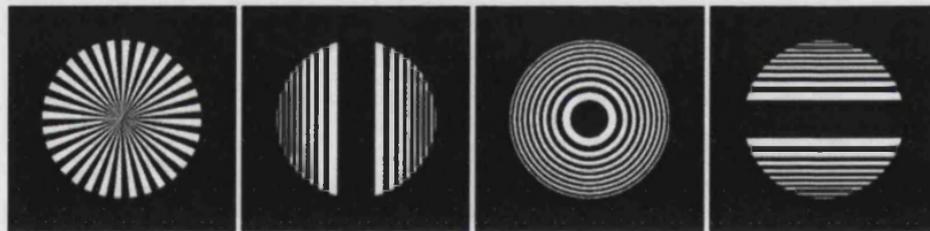


Fig. 5.17. El objeto sintético utilizado para la simulación numérica está compuesto por la repetición en cascada de esta serie de pantallas.

Para el cálculo de cada sección 2D de la imagen es necesario utilizar una respuesta impulsional diferente. De este modo una determinada sección de la imagen 3D es el resultado de la superposición incoherente de las convoluciones 2D entre las diferentes pantallas planas y las correspondientes secciones transversales desenfocadas de la respuesta impulsional asociada a la sección 2D objeto del cálculo.

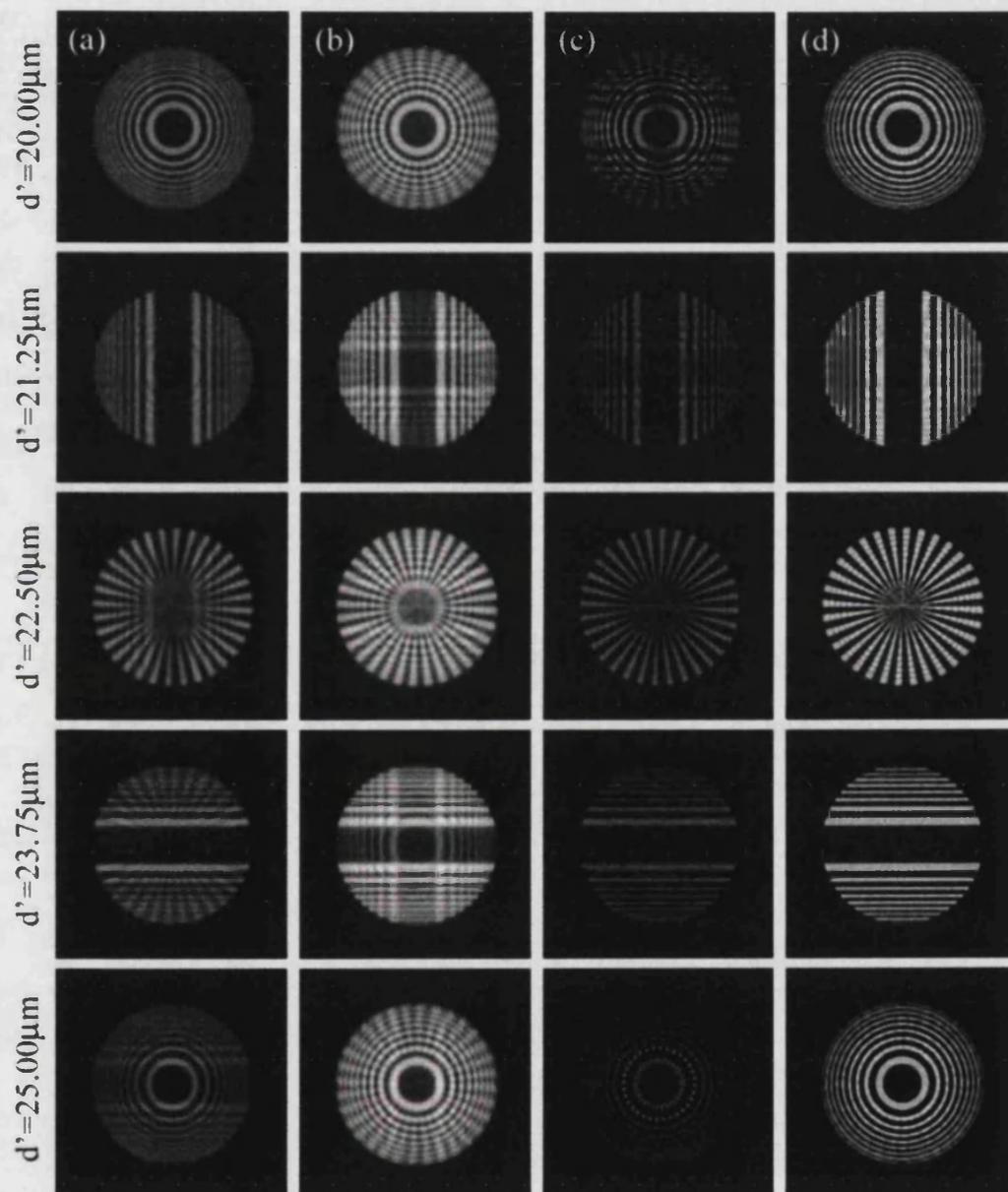


Fig. 5.18. Imágenes correspondientes a cinco de las pantallas obtenidas con: (a) Abertura circular; (b) Filtro cúbico; (c) Abertura circular y desconvolución 3D; (d) Filtro cúbico y desconvolución 3D. Para el cálculo de la desconvolución se ha utilizado, en ambos casos, la respuesta impulsional correspondiente a  $d' = 25 \mu m$ .

En la primera columna de la Fig. 5.18 se muestra las imágenes correspondientes a cinco de las pantallas. Se observa con claridad cómo a medida que aumenta la profundidad de barrido aumenta la influencia de secciones adyacentes en las imágenes de las pantallas planas.

A continuación se muestra en la Fig. 5.19 las componentes axiales de las respuestas impulsionales generadas por el filtro cúbico de fase  $q(\xi) = \exp(-i2\pi A\xi^3)$ , con  $A = 50$ . Tal y como habíamos anunciado, las respuestas son de peor calidad que las proporcionadas por la pupila circular, pero fuertemente invariantes a cambios en la profundidad de barrido.

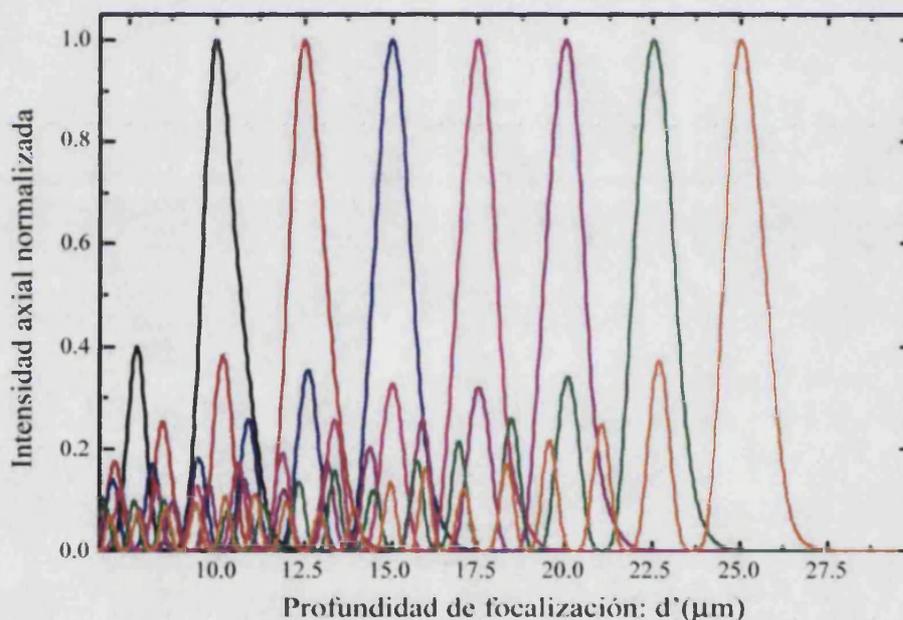


Fig. 5.19. Sección axial de las respuestas impulsionales confocales correspondientes al filtro cúbico de fase.

También en este caso mostramos en la Tabla 5.2 los valores de  $d$  y  $w_{40}$  correspondientes a los 7 valores equidistantes de  $d'$ . Lógicamente, estas respuestas impulsionales proporcionan imágenes de nuestro objeto

3D de peor calidad que la abertura circular. Esto se muestra en la segunda columna de la Fig. 5.18, donde vemos una influencia de secciones adyacentes mayor que en el caso anterior, pero prácticamente independiente de la profundidad de barrido. Esta invariancia es la que ha permitido aplicar técnicas clásicas de desconvolución 3D a la imagen 3D de la que se han mostrado 5 secciones. El resultado de esta desconvolución se muestra en la cuarta columna de la Fig. 5.18. Esta serie de secciones nos permite confirmar la hipótesis de que la técnica híbrida proporciona imágenes altamente insensibles al incremento de la aberración esférica.

$d'(\mu m)$	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0
$d(\mu m)$	13.2	16.5	19.7	22.9	26.3	29.7	33.1
$w_{40}$	-0.2	-0.8	-1.3	-1.8	-2.3	-2.8	-3.4

Tabla 5.2. Valores de  $d$  y  $w_{40}$  para el caso del filtro cúbico de fase.

Por último, en la tercera columna mostramos el resultado de aplicar el algoritmo de desconvolución 3D a la imagen obtenida con la abertura circular. Nótese que hemos realizado esta última simulación por razones de completitud en los resultados presentados. Sin embargo, es evidente que, desde un punto de vista matemático, carece de sentido aplicar un algoritmo de desconvolución a un proceso en que la respuesta impulsional no es espacialmente invariante.



## Capítulo 6

### Técnicas de conformado para incrementar la profundidad de campo

Los sistemas formadores de imágenes son altamente sensibles al desenfoque, es decir, a desajustes entre el plano objeto y el plano de detección. Para muchas aplicaciones prácticas como puede ser en microelectrónica, robótica, microscopía, medicina, etc. es deseable disponer de una gran profundidad de campo que permita obtener imágenes nítidas para un amplio rango de posiciones axiales del objeto. El procedimiento trivial para incrementar la profundidad de campo consiste en reducir la apertura numérica del objetivo. Sin embargo, este procedimiento implicaría una disminución dramática de la resolución transversal. Otras técnicas han sido desarrolladas con este fin, entre las que podemos destacar el conformado del sistema mediante filtros de amplitud [Hammond 2000; Miller y Blanco 2003; Ojeda-Castañeda *et al.* 1989], el empleo de filtros de fase combinado con un posterior procesado digital de la señal [Castro *et al.* 2006; Dowski y Cathey 1995; Mezouari y Harvey 2003; Sherif y Cathey 2003; Zalevsky *et al.* 2006] o incluso, el uso del concepto multifocal, en el cual se emplean lentes que poseen varios focos axiales [Ben-Eliezer *et al.* 2003; Ben-Eliezer *et al.* 2005].



De todas estas posibilidades, en este capítulo nos centraremos en el uso de filtros de amplitud. En el diseño de dichos filtros se aprovechará la analogía entre el comportamiento axial del sistema con aberración esférica y el comportamiento transversal de sistemas 1D con desenfoque.

### 6.1. Diseño de filtros para incrementar la profundidad de campo

Comencemos nuestro estudio particularizando al caso de objetos bidimensionales la expresión que proporciona la distribución de intensidades en el espacio imagen de un sistema telecéntrico, esto es

$$I'(x, y; z) = \frac{1}{M^2} O\left(\frac{x}{M}, \frac{y}{M}\right) \otimes_2 |h'(x, y; z)|^2, \quad (6.1)$$

donde

$$h'(x, y; z) = \iint p(x_p, y_p) \exp\left\{-i \frac{kz}{2f^2} (x_p^2 + y_p^2)\right\} \times \exp\left\{-i \frac{2\pi}{\lambda f} (x_p x + y_p y)\right\} dx_p dy_p. \quad (6.2)$$

En caso en que la función pupila sea separable en coordenadas cartesianas, la respuesta unidad también lo es, y por tanto podemos escribir  $h'(x, y; z) = h'_x(x; z)h'_y(y; z)$ , donde

$$h'_x(x; z) = \int_{-0.5}^{0.5} p(\mu) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f^2} z r_{\max}^2 \mu^2\right) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda f} \sqrt{2} r_{\max} \mu x\right) d\mu. \quad (6.3)$$

En esta ecuación hemos normalizado las coordenadas en el plano de la pupila de la forma

$$\mu = \frac{x_p}{\sqrt{2}r_{\max}}, \quad (6.4)$$

siendo  $r_{\max}$  el radio del círculo en que se inscribe la pupila cuadrada.

Véase que esta expresión es análoga a la Ec. (3.23), lo que implica que la respuesta axial de un sistema formador de imágenes afectado de aberración esférica, presenta un comportamiento similar al de la respuesta transversal de un sistema formador de imágenes con pupila cuadrada.

De este razonamiento es directo concluir que la familia de perfiles de amplitud diseñados en el capítulo anterior, para la disminución del impacto de la aberración esférica, podrá utilizarse también para dotar a los sistemas formadores de imágenes de una mayor tolerancia al desenfoque. Nosotros nos centramos en el perfil, cuya versión cuadrada se muestra en la Fig. 6.1 (b).

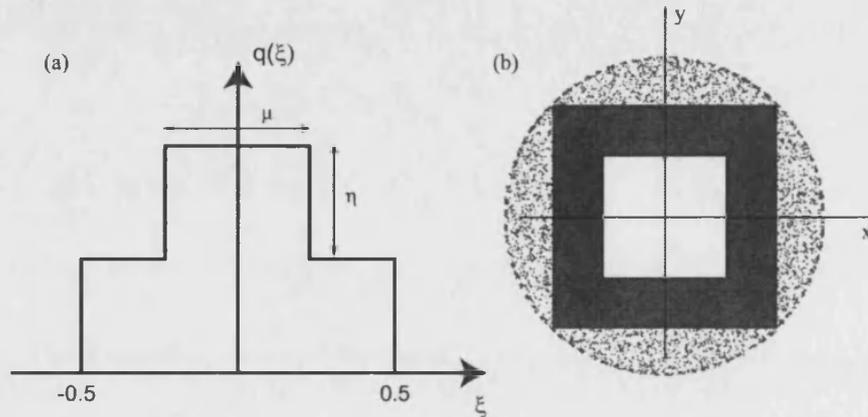


Fig. 6.1. (a) Transmitancia proyectada del filtro para la reducción del impacto de la aberración esférica; (b) Versión cuadrada de dicho filtro.

La figura anterior pone de manifiesto, sin embargo, que al utilizar un filtro cuadrado se produce una pérdida significativa de resolución transversal en ciertas direcciones, al no aprovechar todo el tamaño de la pupila. Por ello, a partir de este filtro cuadrado construimos una versión radial, ver Fig. 6.2, de tal forma que la resolución transversal sea la misma en todas las direcciones. Tras un procedimiento numérico de optimización seleccionamos los valores  $\nu = 0.4$  y  $\eta = 0.7$ .

Naturalmente, para calcular la respuesta unidad en este caso es más conveniente reescribir la Ec. (6.2) en coordenadas cilíndricas, esto es

$$h(r; z) = 2\pi \int_0^1 p(\rho) \exp\{i2\pi w_{20} \rho^2\} J_0\left(\frac{2\pi r_{\max}}{\lambda f} \rho r\right) \rho d\rho, \quad (6.5)$$

donde  $\rho = r_p / r_{\max}$ , y hemos definido el coeficiente de desenfoque como

$$w_{20} = -\frac{r_{\max}^2 z}{2\lambda f^2} \quad (6.6)$$

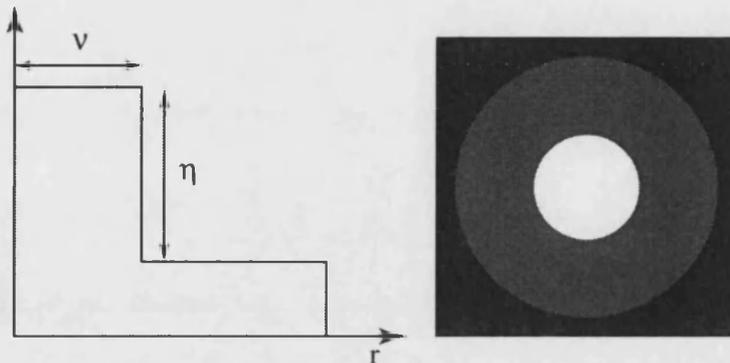


Fig. 6.2. Transmitancia real del filtro que incrementa la profundidad de campo.

## 6.2. Verificación experimental

### 6.2.1. Sistema formador de imágenes con apertura numérica baja

En esta sección proponemos un experimento sencillo para ilustrar los efectos del desenfoque dentro del ámbito paraxial. Para que sirva de comparación, mostramos también los resultados obtenidos mediante una simulación numérica, tanto para la pupila circular como para el filtro diseñado, de las imágenes correspondientes a diferentes planos de desenfoque de un test de resolución, como el que se ilustra en la Fig. 6.3.

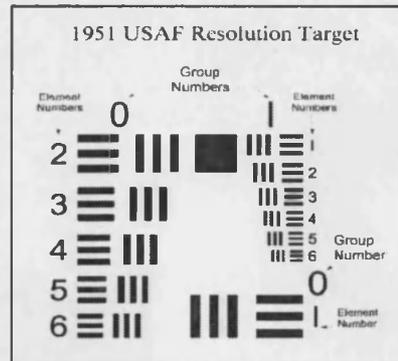


Fig. 6.3. Test de resolución.

El dispositivo experimental utilizado para nuestro experimento se muestra en la Fig. 6.4. La luz emitida por una fuente de luz blanca, tras pasar a través de un difusor, ilumina el objeto bidimensional situado en el plano focal objeto de la lente  $L_1$  ( $f_1 = 400mm$ ), uniforme e incoherentemente. Los patrones de difracción se propagan en el espacio libre hasta llegar al diafragma de apertura del sistema, el cual se encuentra en el plano focal imagen de  $L_1$ . Dicho plano resulta ser también, el plano focal objeto de una segunda lente esférica,  $L_2$ , de  $f_2 = 100mm$ . Por tanto, la imagen final del objeto se haya en el plano focal imagen de esta segunda lente que conforma el sistema telecéntrico. Para analizar el efecto del desenfoque capturamos, mediante una cámara CCD monocroma (Pulnix TM-765E con  $756 \times 581$  píxeles de  $11 \times 11 \mu m$  y 8 bits de rango dinámico), las imágenes correspondientes a diferentes planos que distan una cierta cantidad  $z$  del plano focal  $F_2'$ . La cámara CCD se halla montada sobre un desplazador micrométrico para facilitar el desplazamiento de la misma a lo largo del eje óptico.

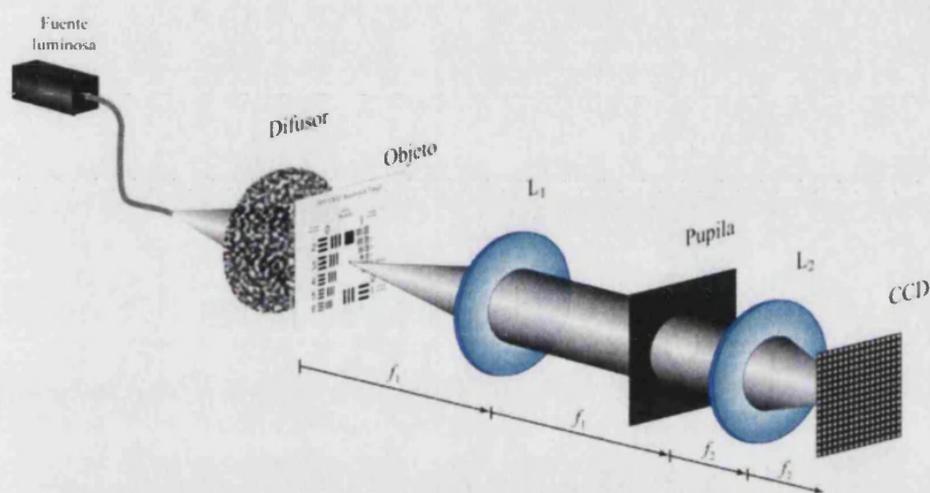


Fig. 6.4. Esquema del montaje experimental empleado.

En las Figs. 6.5 y 6.6 se muestran las imágenes obtenidas de forma numérica y experimentalmente, respectivamente, del test de resolución mostrado en la Fig. 6.3, tanto para la pupila circular como para el filtro tolerante al desenfoque. Dichas imágenes corresponden a los coeficientes  $w_{20} = 0, -1, -2$  y  $-3$ , valores que se corresponden con las posiciones axiales  $z = 0, 2.75\text{mm}, 5.50\text{mm}$  y  $8.25\text{mm}$ , respectivamente. Imágenes similares, por ello no se representan, se obtienen para cantidades positivas del coeficiente de desenfoque, ya que la respuesta unidad es simétrica respecto del plano focal.

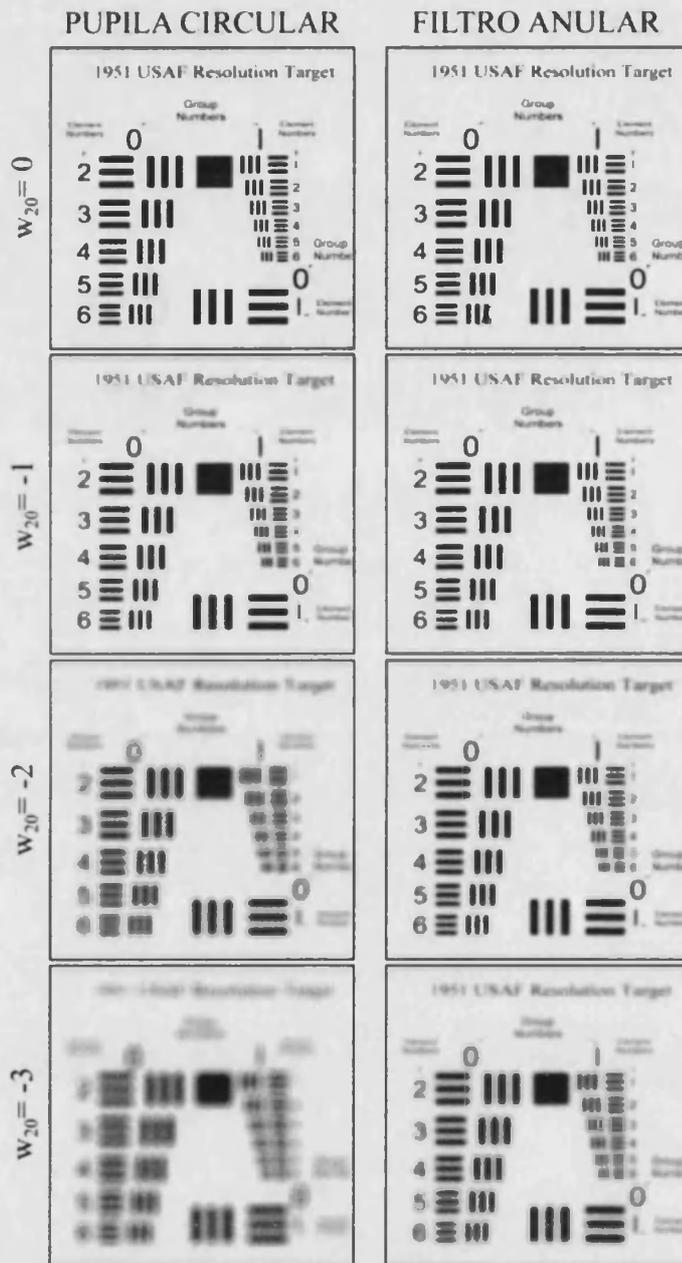


Fig. 6.5. Simulación numérica de formación de imágenes desenfocadas con la pupila circular y con el filtro anular tolerante al desenfoque.

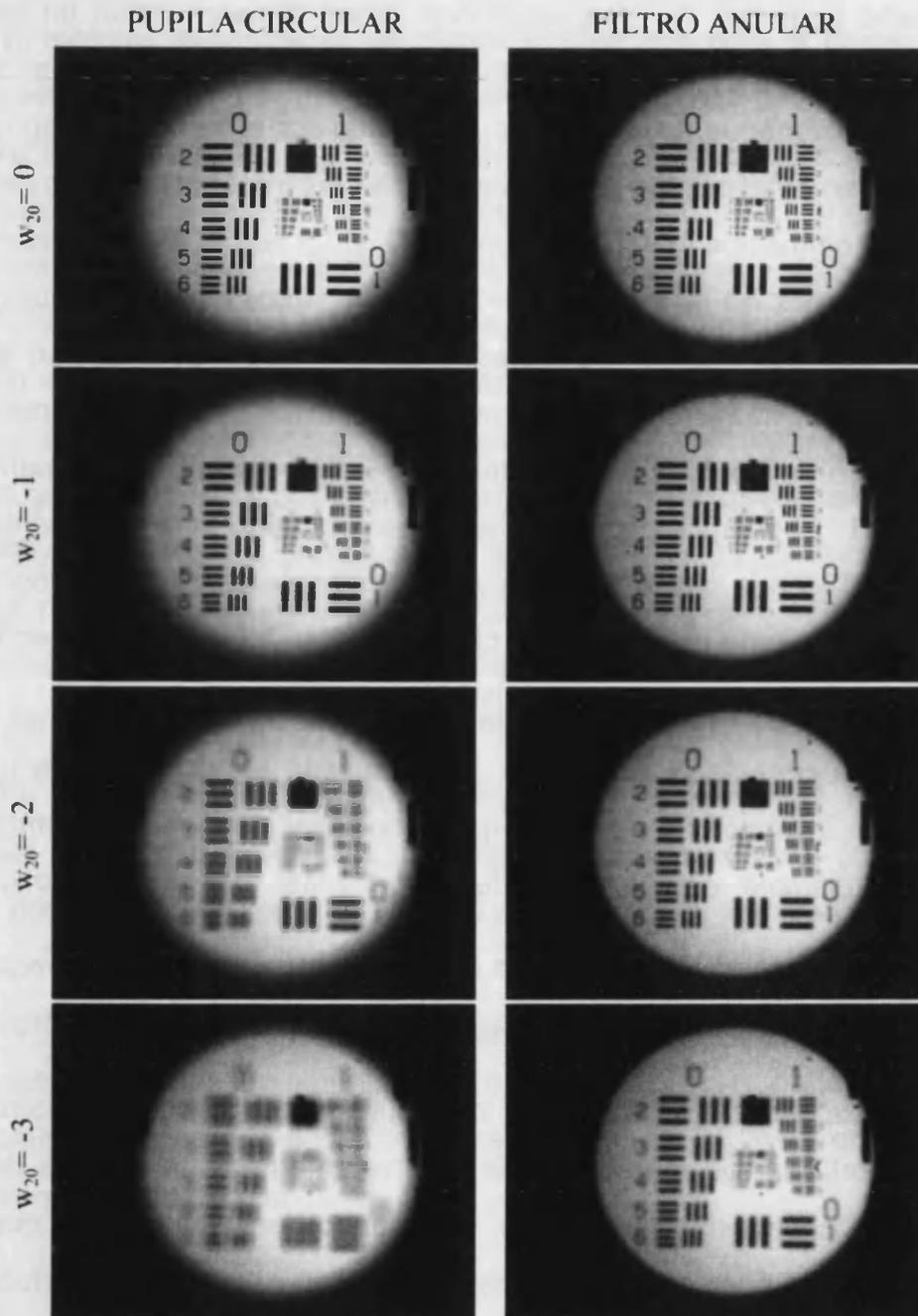


Fig. 6.6. Imágenes experimentales del test de resolución para la pupila circular y para el filtro anular tolerante al desenfoque.

Como podemos ver, los resultados experimentales están en buena concordancia con los teóricos. Conforme incrementamos el valor del coeficiente de desenfoque, la imagen proporcionada por el sistema sin apodizar sufre un gran deterioro, no llegando a resolver las frecuencias bajas reflejadas en los elementos 1 y 2 del grupo 0 (1 y  $1.2 \text{ mm}^{-1}$ , respectivamente), cuando estamos en el caso  $w_{20} = -3$ . Sin embargo, para la situación del sistema apodizado con el filtro anular, apenas existe degradación en la calidad de la imagen, llegando incluso a discernirse frecuencias de  $2.52 \text{ mm}^{-1}$  en el caso  $w_{20} = -3$  como las correspondientes al elemento 3 del grupo 1. Podríamos decir que, la imagen obtenida para un desenfoque de  $w_{20} = -1$  con la pupila circular es prácticamente similar a la proporcionada por el sistema con  $w_{20} = -3$ , cuando el filtro tolerante al desenfoque actúa sobre la pupila de salida del sistema.

Otro efecto a tener en cuenta, y que sucede en el caso de la pupila clara, es la inversión de contraste que tiene lugar en diversos elementos, como por ejemplo los elementos del grupo 1 del test correspondiente a  $w_{20} = -2$ .

### 6.2.2. Microscopía convencional de barrido

En esta sección, trasladamos los resultados obtenidos anteriormente al caso particular de la microscopía, concretamente a un sistema de microscopía convencional de barrido, basándonos en el hecho de que las ecuaciones que rigen ambos sistemas son similares, como ya se estudió en el Capítulo 2.

El montaje experimental es similar al diseñado para el estudio de la respuesta axial del sistema frente a diferentes valores del coeficiente de aberración esférica, Fig. 5.10, en el que se han introducido algunas modificaciones. En este caso, se usa un objetivo planacromático (Nikon), lo que significa que el grado de corrección de la aberración esférica y cromática, así como de la curvatura de campo, es muy alto. La apertura numérica del mismo es de 0.9. La muestra empleada corresponde a un pequeño fragmento de un CD de música original, es decir, el objeto es un conjunto de pistas grabadas en el CD. Por último, el estenope empleado posee un radio de  $500\mu m$ , lo que nos garantiza que la detección ya no es confocal y estamos, por tanto, ante un sistema de barrido cuya respuesta es similar a la de un sistema de microscopía convencional [Gauderon y Sheppard 1999; Gu y Sheppard 1993; Kimura y Munakata 1990; Wilson y Carlini 1988].

En la Fig. 6.7 se muestran los resultados experimentales. Nótese que en este caso un incremento de una unidad en el valor de  $w_{20}$  corresponde a un desplazamiento axial de  $z = 1.12\mu m$ . A la vista de esta última figura no cabe duda de que el filtro tolerante al desenfoque, también en sistemas de microscopía convencional de barrido, proporciona un comportamiento muy estable frente a incrementos del coeficiente de desenfoque, mejorando notablemente la calidad de las imágenes a partir de  $w_{20} = -2$  en comparación con la pupila circular.

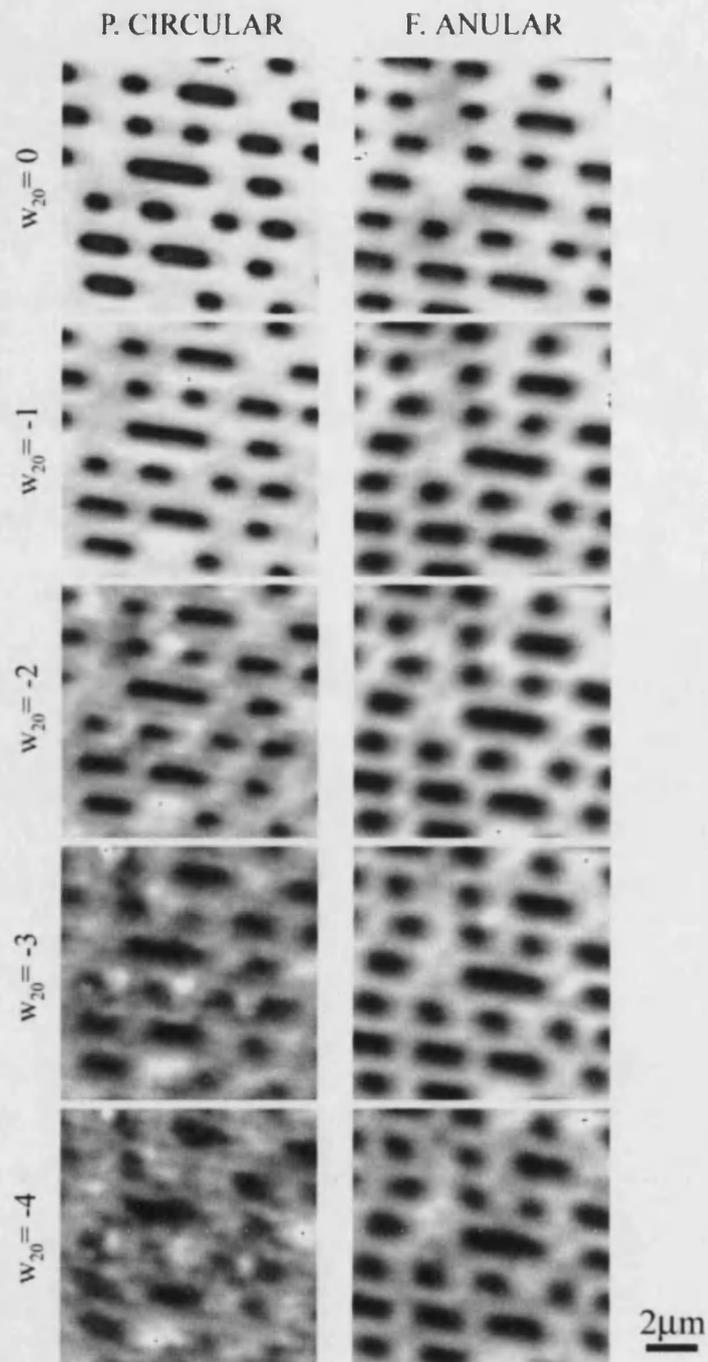


Fig. 6.7. Imágenes experimentales de las pistas de un CD obtenidas con la pupila circular y con el filtro tolerante al desenfoque.

## Capítulo 7

### Conclusiones

En esta Conclusión general queremos hacer un breve resumen de los logros alcanzados en este trabajo y apuntar al mismo tiempo algunas perspectivas para proseguir nuestra investigación en un futuro.

En los sistemas telecéntricos, la formación de imágenes es un proceso lineal e invariante a desplazamientos 3D ( $LSI$  3D). Como consecuencia de ello, hemos analizado como la respuesta de estos sistemas queda plenamente caracterizada en términos de la respuesta unidad de un sistema focalizador.

A partir de este resultado, hemos revisado el efecto que tiene en la respuesta de un sistema focalizador el desajuste del índice de refracción entre la muestra y el medio que la rodea así como las variaciones en la longitud de tubo del objetivo de microscopio. Es de gran interés práctico estudiar la posibilidad de corregir dichas aberraciones ya que pueden afectar fuertemente a la calidad de la imagen en sistemas de microscopía. Hemos obtenido una expresión que nos proporciona la aberración esférica

inducida y hemos conseguido expresar el efecto de ésta sobre la respuesta del sistema con una fórmula cerrada.

A continuación, hemos desarrollado un formalismo matemático para analizar dicho efecto, basado en la propagación de la varianza de la respuesta axial del sistema en términos del coeficiente de aberración esférica. Este análisis nos ha permitido, posteriormente, definir una función de mérito, la tolerancia a la aberración esférica, que nos ha servido para diseñar un filtro de amplitud anular óptimo para disminuir la sensibilidad del sistema frente a estas distorsiones de fase. Para demostrar la bondad de la técnica propuesta hemos llevado a cabo la medida experimental de la respuesta axial de un dispositivo real de microscopía confocal de barrido, comprobando que se obtiene una reducción significativa de la sensibilidad a la aberración esférica mediante el uso del filtro anular.

Finalmente, a partir del estudio llevado a cabo sobre la aberración esférica, hemos sido capaces de incrementar, experimentalmente, la profundidad de campo mediante el empleo de filtros de amplitud, en un sistema formador de imágenes de apertura numérica baja y en un sistema de microscopía confocal de barrido.

Este trabajo abre una serie de líneas de interés para la investigación futura. En el campo teórico, la extensión del formalismo de los momentos generalizados a funciones que presenten discontinuidades finitas en el *interior* de su soporte, permitirá abordar con rigor el análisis del efecto de la aberración esférica en sistemas con pupilas con aberturas múltiples. Ejemplos de este tipo son muchos de los filtros anulares empleados en micros-

copía, así como la mayor parte de los elementos difractivos tales como las placas zonales.

Desde un punto de vista práctico, el incremento de la tolerancia a la aberración esférica de sistemas de focalización, como los empleados en irradiación de materiales en profundidad, o sistemas de confinamiento, como las *pinzas ópticas*, representan sólo una muestra de la capacidad de la técnica aquí presentada para mejorar las prestaciones de multitud de dispositivos ópticos.



## Anexo A

### Algunas propiedades de la evolución de la varianza

#### ► PARTE I

Consideremos la expresión que nos proporciona la propagación de la varianza asociada a la variable  $u$  en función del parámetro de evolución  $z$

$$\sigma_u^2(z) = \sigma_u^2(0) + \frac{\beta_2^2}{4\pi^2} \sigma_x^2(0) z^2 - \left\{ \frac{i\beta_2}{2\pi^2 \langle u^0 \rangle_0} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx + \frac{1}{2} \langle u^0 \rangle_0 \right] + \frac{\beta_2 \langle x^1 \rangle_0 \langle u^1 \rangle_0}{\pi \langle u^0 \rangle_0^2} \right\} z. \quad (\text{A.1})$$

A continuación, resolvemos la integral por partes, integrando y derivando las cantidades  $df/dx$  y  $xf^*$ , respectivamente, como se muestra en la siguiente expresión

$$\int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx = \left| \begin{array}{l} xf^* \rightarrow \left( f^* + x \frac{df^*}{dx} \right) dx \\ \frac{df}{dx} dx \rightarrow f \end{array} \right| = \quad (\text{A.2})$$

$$= x |f(x;0)|^2 \Big|_{-\infty}^{\infty} - \int_{-\infty}^{\infty} |f(x;0)|^2 dx - \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df^*(x;0)}{dx} f(x;0) dx.$$

Nótese que el primer término de esta integral es idénticamente nulo debido a que la función  $f(x;0)$  es de módulo integrable en todo  $\mathbb{R}$ , lo que significa que debe anularse en  $\pm\infty$ .

Teniendo en cuenta la propiedad  $\frac{df^*}{dx} = \left(\frac{df}{dx}\right)^*$ , llevamos a cabo la siguiente agrupación de integrales

$$\int_{-\infty}^{\infty} x \left\{ \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) + \left(\frac{df(x;0)}{dx}\right)^* f(x;0) \right\} dx = - \int_{-\infty}^{\infty} |f(x;0)|^2 dx, \quad (\text{A.3})$$

lo que, de modo resumido, podemos escribir de la forma

$$2\Re \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx \right\} = - \int_{-\infty}^{\infty} |f(x;0)|^2 dx = -\langle u^0 \rangle_0, \quad (\text{A.4})$$

donde  $\Re$  indica la parte real. En este último paso las relaciones a tener en mente son: la Ec. (4.9),  $\alpha + \alpha^* = 2\Re(\alpha)$  y el hecho de que  $x$  es una variable real. De esta forma, el término  $\Re$  ha podido salir fuera de la integral. Así, teniendo en cuenta este desarrollo, la Ec. (A.1) queda de la forma

$$\begin{aligned} \sigma_u^2(z) = & \sigma_u^2(0) + \frac{\beta_2^2}{4\pi^2} \sigma_x^2(0) z^2 + \\ & + \left[ \frac{\beta_2}{2\pi^2 \langle u^0 \rangle_0} \Im \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) du \right\} - \frac{\beta_2}{\pi \langle u^0 \rangle_0^2} \langle x^1 \rangle_0 \langle u^1 \rangle_0 \right] z, \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

donde  $\Im$  representa la parte imaginaria.

➤ PARTE II

Si la función  $f(x;0)$  es real, el coeficiente  $B$  de la Ec. (4.21),

$$B = \frac{\beta_2}{2\pi^2 \langle u^0 \rangle_0} \Im m \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx \right\} - \frac{\beta_2}{\pi \langle u^0 \rangle_0^2} \langle x^1 \rangle_0 \langle u^1 \rangle_0, \quad (\text{A.6})$$

es idénticamente nulo por los siguientes razonamientos:

- Por un lado tenemos

$$\Im m \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} x \frac{df(x;0)}{dx} f^*(x;0) dx \right\} = 0, \quad (\text{A.7})$$

ya que tanto  $x$  como  $f(x;0)$  son reales.

- Por otro lado, como  $f(x;0)$  es una función real, entonces,  $F(u;0)$  es una función hermítica tal que

$$\langle u^1 \rangle_0 = \int_{-\infty}^{\infty} u |F(u;0)|^2 du = 0, \quad (\text{A.8})$$

debido a que el integrando es una función impar.



## Anexo B

### Analogías con la Mecánica Cuántica

En este anexo veremos, brevemente, la similitud existente entre el desarrollo llevado a cabo en el Capítulo 4, con un desarrollo análogo realizado a partir de la Mecánica Cuántica. Podemos deducir las ecuaciones equivalentes para la propagación de momentos y de la desviación estándar en términos cuánticos, simplemente realizando una identificación de variables. Consideremos  $F(u; z)$  dada por

$$F(u; z) = F(u; 0) \exp\left(i \frac{\beta_2}{2} u^2 z\right). \quad (\text{B.1})$$

Ahora hallamos su transformada de Fourier,  $f(x; z)$ , y obtenemos la ecuación de ondas que rige dicha propagación

$$\frac{\partial^2 f(x; z)}{\partial x^2} = i \frac{8\pi^2}{\beta_2} \frac{\partial f(x; z)}{\partial z}. \quad (\text{B.2})$$

Si ahora recuperamos de la Mecánica Cuántica la función de ondas expresada en el espacio de posiciones y la ecuación de ondas de Schrödinger dependiente del tiempo para una partícula libre de masa  $m$  [Sakurai 1985],

$$\psi(x) = \frac{1}{2\pi\hbar} \int_{-\infty}^{\infty} \phi(p) e^{i\frac{p}{\hbar}x} dp, \quad (\text{B.3})$$

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \psi(x;t)}{\partial x^2} = i\hbar \frac{\partial \psi(x;t)}{\partial t}, \quad (\text{B.4})$$

podemos realizar la siguiente identificación de variables comparando las Ecs. (4.3) y (B.3), por un lado, y (B.2) con (B.4), por otro

$$\begin{aligned} u &\rightarrow -\frac{p}{2\pi\hbar} \\ z &\rightarrow t \\ \beta_2 &\rightarrow -\frac{4\pi^2\hbar}{m}. \end{aligned} \quad (\text{B.5})$$

A continuación, recuperamos las ecuaciones que nos proporcionan la propagación de los momentos, (4.19), y realizamos el cambio de variable detallado anteriormente, de tal manera que el resultado obtenido puede expresarse de la forma

$$\begin{aligned} \langle x^0 \rangle_t &= \langle x^0 \rangle_{t=0} \\ \langle x \rangle_t &= \langle x \rangle_{t=0} + \frac{1}{m} \langle p \rangle_{t=0} t \\ \langle x^2 \rangle_t &= \langle x^2 \rangle_{t=0} + \frac{1}{m^2} \langle p^2 \rangle_{t=0} t^2, \end{aligned} \quad (\text{B.6})$$

donde hemos supuesto una función de ondas tal que  $\langle xp \rangle = 0$ , para simplificar los resultados. Estas ecuaciones corresponden a los conocidos teoremas de Ehrenfest de la Mecánica Cuántica.

## Anexo C

### Forma alternativa de expresar el momento de segundo orden

Veamos una forma alternativa de calcular el momento de segundo orden  $\langle u^2 \rangle$ . En primer lugar, a partir de la Ec. (4.3) es directo obtener

$$\frac{df(x)}{dx} = i2\pi \int_{-\infty}^{\infty} uF(u) e^{i2\pi ux} du. \quad (\text{C.1})$$

De esta manera, podemos escribir la relación

$$\begin{aligned} \int_{-\infty}^{\infty} \left| \frac{df(x)}{dx} \right|^2 dx &= \\ &= 4\pi^2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} uu'F(u)F^*(u') \exp[i2\pi(u-u')x] dud'u' dx. \end{aligned} \quad (\text{C.2})$$

Teniendo en cuenta la definición de la función delta

$$\delta(u-u') = \int_{-\infty}^{\infty} \exp[i2\pi(u-u')x] dx, \quad (\text{C.3})$$

podemos escribir la Ec. (C.2) de la forma

$$\int_{-\infty}^{\infty} \left| \frac{df(x)}{dx} \right|^2 dx = 4\pi^2 \int_{-\infty}^{\infty} u^2 |F(u)|^2 du, \quad (\text{C.4})$$

que nos relaciona el momento de segundo orden  $\langle u^2 \rangle$ , con la derivada de la función  $f(x)$ .

## Referencias

- ABBE, E. (1873). "Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung", Arch. F. Mikroskop, Anat., **9**, 413-420.
- AZZAM, R.M.A Y BASHARA, N.M. (1992). *Ellipsometry and polarizad light*. North Holland, Amsterdam.
- BAHLMANN, K. Y HELL, S.W. (2000). "Depolarization by high aperture focusing", Appl. Phys. Lett., **77**, 612-614.
- BELANGER, P.A. (1991). "Beam propagation and the ABCD ray matrices", Opt. Lett., **16**, 196-198.
- BELANGER, P.A., CHAMPAGNE, Y. Y PARE, C. (1994). "Beam propagation factor of diffracted laser beams", Opt. Commun., **105**, 233-242.
- BEN-ELIEZER, E., ZALEVSKY, Z., MAROM, E. Y KONFORTI, N. (2003). "All-optical extended depth of field imaging system", J. Opt. A: Pure App. Opt., **5**, 164-169.
- BEN-ELIEZER, E., MAROM, E., KONFORTI, N. Y ZALEVSKY, Z. (2005). "Experimental realization of an imaging system with an extended depth of field", Appl. Opt., **44**, 2792-2798.
- BLANCA, C.M. BEWERSDORF, J. Y HELL, S. (2001). "Single sharp spot in fluorescence microscopy of two opposing lenses", Appl. Phys. Lett., **79**, 2321-2323.

## Referencias

---

- BLANCA, C.M. Y HELL, S.W. (2002). "Axial superresolution with ultrahigh aperture lenses", *Opt. Expr.*, **10**, 893-898.
- BOLIN, F.P., PREUSS, L.E., TAYLOR, R.C. Y FERENEC, R.J. (1989). "Refractive-index of some mammalian-tissues using a fiber optic cladding method", *Appl. Opt.*, **28**, 2297-2303.
- BOOTH, M.J., NEIL, M.A.A. Y WILSON, T. (1998). "Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media", *J. Microsc.*, **192**, 90-98.
- BOOTH, M.J. Y WILSON, T. (2000). "Strategies for the compensation of specimen-induced spherical aberration in confocal microscopy of skin", *J. Microsc.*, **200**, 68-74.
- BOOTH, M.J., NEIL, M.A.A., JUSKAITIS, R. Y WILSON, T. (2002). "Adaptative aberration correction in a confocal microscope", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 5788-5792.
- BORN, M. Y WOLF, E. (1999). *Principles of Optics*. Pergamon.
- BOYER, G. (2002). "New class of axially apodizing filters for confocal scanning microscopy", *J. Opt. Soc. Am. A*, **19**, 584-589.
- BOYER, G. (2003). "3D behaviour of Frieden filters in confocal imaging", *Micron*, **34**, 275-282.
- BRAAT, J. (1997). "Influence of substrate thickness on optical disk readout", *Appl. Opt.*, **36**, 8056-8062.
- BRADBURN, S., CATHEY, W.T. Y DOWSKY, E.R. (1997). "Realizations of focus invariance in optical-digital systems with wave-front coding", *Appl. Opt.*, **36**, 9157-9166.

- 
- BRAKENHOFF, G.J., BLOM, P. Y BAREND S P. (1979). "Confocal scanning light-microscopy with high aperture immersion lenses", *J. Microsc.*, **117**, 219-232.
- BRAKENHOFF, G.J., VANDERVOORT, H.T.M., VANSPRONSEN, E.A. Y NANNINGA, N. (1988). "Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy", *J. Mic.*, **153**, 151-159.
- CAMPOS, J., ESCALERA, J. C., SHEPPARD, C.J.R. Y YZUEL, M.J. (2000). "Axially invariant pupil filters", *J. Mod. Opt.*, **47**, 57-68.
- CARLSSON, K., DANIELSSON, P.E., LENZ, R., LILJEBORG, A., MAJLOF, L. Y ASLUND, N. (1985). "Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope", *Opt. Lett.*, **10**, 53-55.
- CASTRO, A., OJEDA-CASTANEDA, J. Y LOHMANN, A.W. (2006). "Bow-tie effect: differential operator", *Appl. Opt.*, **45**, 7878-7884.
- CHI, W.L. Y GEORGE, N. (2001). "Electronic imaging using a logarithmic asphere", *Opt. Lett.*, **26**, 875-877.
- CHON, J.W.M., GAN, X. Y GU, M. (2002). "Splitting of the focal spot of a high numerical-aperture objective in free space", *Appl. Phys. Lett.*, **81**, 1576-1578.
- COHEN, L. (1995). *Time-frequency analysis*. Prentice-Hall.
- DAY, D. Y GU, M. (1998). "Effects of refractive-index mismatch on three-dimensional optical data-storage density in a two-photon bleaching polymer", *Appl. Opt.*, **37**, 6299-6304.
- DEBYE, P. (1909). "The behaviour of light waves nearing combustion or a caustic line", *Ann. D. Physik*, **30**, 755-776.
- DICKEY F.M. Y HOLSWADE S.C. (2000). *Beam shaping: theory and techniques*. Marcel Dekker (New York).

## Referencias

---

- DING, Z.H., WANG, G., GU, M., WANG, Z. Y FAN, Z. (1997). "Superresolution with an apodization film in a confocal setup", *Appl. Opt.*, **36**, 360-363.
- DORN, R., QUABIS, S. Y LEUCHS, G. (2003). "The focus of light-linear polarization breaks the rotational symmetry of the focal spot", *J. Mod. Opt.*, **50**, 1917-1926.
- DOWSKI, E.R. Y CATHEY, W.T. (1995). "Extended depth of field through wave-front coding", *Appl. Opt.*, **34**, 1859-1865.
- ESCOBAR, I., G. SAAVEDRA, G., LANCIS, J. Y MARTÍNEZ-CORRAL, M. (2006). "Reduction of the spherical aberration effect in high-numerical-aperture optical scanning instruments", *J. Opt. Soc. Am. A*, **23**, 3150-3155.
- ESCOBAR, I., G. SAAVEDRA, G., PONS, A. Y MARTÍNEZ-CORRAL, M. (2008). "Simple demonstration of the impact of spherical aberration in optical imaging", *Eur. J. Phys.* (aceptado).
- GANIC, D., CHON, J.W.M. Y GU, M. (2003). "Effect of numerical aperture on the spectral splitting feature near phase singularities of focused waves", *Appl. Phys. Lett.*, **83**, 1527-1528.
- GASKILL, J.D. (1978). *Linear system, Fourier Transforms, and Optics*. Wiley. pp. 212-214.
- GAUDERON, R. Y SHEPPARD, C.J.R. (1999). "Effect of a finite-size pinhole on noise performance in single-, two-, and three-photon confocal fluorescence microscopy", *Appl. Opt.*, **38**, 3562-3565.
- GOODMAN, J.W. (1996). *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill.
- GOPPERT-MAYER, M. (1931). "Elementary file with two quantum fissures", *Ann. Phys.*, **9**, 273-294.

- GU, M. Y SHEPPARD, C.J.R. (1993). "Effects of a finite-sized pinhole on 3D image-formation in confocal two-photon fluorescence microscopy", *J. Mod. Opt.*, **40**, 2009-2024.
- GU, M., TANNOUS, T. Y SHEPPARD, C.J.R. (1994). "Improved axial resolution in confocal fluorescence microscopy using annular pupils", *Opt. Commun.*, **110**, 533-539.
- GU, M. (1996). *Principles of three-dimensional imaging in confocal microscopes*. World Scientific.
- GU, M. (2000). *Advanced optical imaging theory*. Springer.
- HAMILTON, D.K., WILSON, T. Y SHEPPARD, C.J.R. (1981). "Experimental observations of the depth-discrimination properties of scanning microscopes", *Opt. Lett.*, **6**, 625-626.
- HAMMOND, C.M. (2000). "Apparatus and method for reducing imaging errors in imaging systems having an extended depth of field", US patent 6097856.
- HECHT, E. (2000). *Óptica*. Addison Wesley.
- HELL, S. Y STELZER, E.H.K. (1992). "Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope", *J. Opt. Soc. Am. A*, **9**, 2159-2166.
- HELL, S., REINER, G., CREMER, C. Y STELZER, E.H.K. (1993). "Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive-index", *J. Microsc.*, **169**, 391-405.
- HELL, S.W. (2003). "Toward fluorescence nanoscopy", *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1347-1355.
- IBÁÑEZ-LOPEZ, C., ESCOBAR, I., SAAVEDRA, G. Y MARTÍNEZ-CORRAL, M. (2004). "Optical-sectioning improvement in two-color excitation scanning microscopy", *Microsc. Res. Tech.*, **64**, 96-102.

## Referencias

---

- JACQUINOT P. Y ROIZEN-DOSSIER B. (1964). *Progress in Optics*, volumen 3, Capítulo Apodization, pp. 29-186. North-Holland.
- JUANA, D.M., OTI, J.E., CANALES, V.F. Y CAGIGAL, M.P. (2003a). "Design of superresolving continuous phase filters", *Opt. Lett.*, **28**, 607-609.
- JUANA, D.M., OTI, J.E., CANALES, V.F. Y CAGIGAL, M.P. (2003b). "Transverse or axial superresolution in a 4Pi confocal microscope by phase-only filters", *J. Opt. Soc. Am. A.*, **20**, 2172-2178.
- JUSKAITIS, R. (2003). "Characterizing high numerical aperture microscope objective lenses", En *Optical Imaging and Microscopy*. Eds. Török, P., Kao, F.G. Berlin: Springer.
- KE, P.C. Y GU, M. (1998). "Characterization of trapping force in the presence of spherical aberration", *J. Mod. Opt.*, **45**, 2159-2168.
- KIMURA, S. Y MUNAKATA, C. (1990). "Dependence of 3-D optical transfer functions on the pinhole radius in a fluorescent confocal optical microscope", *Appl. Opt.*, **29**, 3007-3011.
- KLAR, T.A., ENGEL, E. Y HELL, S.W. (2001). "Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes", *Phys. Rev. E*, **64**, 066613-1-9.
- LIM, M. Y SALOMA, C. (2002). "Confocality condition in two-color excitation microscopy with two focused excitation beams", *Opt. Comm.*, **207**, 121-130.
- LINDEK, S. Y STELZER, E.H.K. (1999). "Resolution improvement by nonconfocal theta microscopy", *Opt. Lett.*, **24**, 1505-1507.
- LINDEK, S., SWOGER, J. Y STELZER, E.H.K. (1999). "Single-lens theta microscopy: resolution, efficiency and working distance", *J. Mod. Opt.*, **46**, 843-858.

- 
- LÜ, B.D., ZHANG, B. Y LUO, S. (1999). "Far-field intensity distribution,  $M^2$  factor, and propagation of flattened Gaussian beams", *Appl. Opt.*, **38**, 4581-4584.
- LÜ, B. Y LUO, S. (2000). "Beam propagation factor of hard-edge diffracted cosh-Gaussian beams", *Opt. Commun.*, **178**, 275-281.
- LÜ, B. Y LUO, S. (2001). "Generalized  $M^2$  factor of hard-edge diffracted flattened Gaussian beams", *J. Opt. Soc. Am. A*, **18**, 2098-2101.
- LÜ, B. Y LUO, S. (2004). "Parametric characterization of rotationally symmetric hard-edged diffracted beams", *J. Opt. Soc. Am. A*, **21**, 193-198.
- MAHAJAN V.N. (1991). *Aberration theory made simple*. SPIE Press.
- MARTÍNEZ-CORRAL, M., ANDRÉS, P., OJEDA-CASTAÑEDA, J. Y SAAVEDRA, G. (1995). "Tunable axial superresolution by annular binary filters. Application to confocal microscopy", *Opt. Comm.*, **119**, 491-498.
- MARTÍNEZ-CORRAL, M., KOWALCZYK, M., ZAPATA-RODRÍGUEZ, C. Y ANDRÉS, P. (1998). "Tunable axial resolution in confocal scanning microscopy by controlled symmetrical defocusing", *Optica Applicata*, **28**, 213-225.
- MARTÍNEZ-CORRAL, M., MUNOZ-ESCRIVA, L., KOWALCZYK, M. Y CICHOCKI, T. (2001). "One-dimensional iterative algorithm for three-dimensional point-spread function engineering", *Opt. Lett.*, **26**, 1861-1863.
- MARTÍNEZ-CORRAL, M., CABALLERO, M.T. Y PONS, A. (2002a). "Axial apodization in 4Pi-confocal microscopy by annular binary filters", *J. Opt. Soc. Am. A*, **19**, 1532-1536.
- MARTÍNEZ-CORRAL, M., CABALLERO, M.T., STELZER, E.H.K Y SWOGER, J. (2002b). "Tailoring the axial shape of the point spread function using the Toraldo concept", *Opt. Expr.*, **10**, 98-103.

## Referencias

---

- MARTÍNEZ-CORRAL, M., CABALLERO, M.T., PONS, A. Y ANDRÉS, P. (2003a). "Sidelobe decline in single-photon 4Pi microscopy by Toraldo rings", *Micron*, **34**, 319-325.
- MARTÍNEZ-CORRAL, M., IBÁÑEZ-LÓPEZ, C., CABALLERO, M.T. Y SAAVEDRA, G. (2003b). "Three-ring filter increases the effective NA up to 1.46 in optical sectioning fluorescence microscopy", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**, 1669-1674.
- MARTÍNEZ-CORRAL, M., MARTÍNEZ-CUENCA, R., ESCOBAR, I. Y SAAVEDRA, G. (2004). "Reduction of focus size in tightly focused linearly polarized beams", *Appl. Phys. Lett.*, **85**, 4319-4321.
- MARTÍNEZ-HERRERO, R. Y MEJÍAS, P.M. (1993). "Second-order spatial characterization of hard-edge diffracted beams", *Opt. Lett.*, **18**, 1669-1671.
- MARTÍNEZ-HERRERO, R., MEJÍAS, P.M. Y ARIAS, M. (1995a). "Parametric characterization of coherent, lowest-order Gaussian beams propagating through hard-edged apertures", *Opt. Lett.*, **20**, 124-126.
- MARTÍNEZ-HERRERO, R., MEJÍAS, P.M. Y MARTÍNEZ, C. (1995b). "Parametric characterization of the phase at the far field", *Opt. Lett.*, **20**, 651-653.
- MARTÍNEZ-HERRERO, R. MEJIAS, P.M., BOSCH, S. Y CARNICER, A. (2001). "Vectorial structure of nonparaxial electromagnetic beams", *J. Opt. Soc. Am. A*, **18**, 1678-1680.
- MARTÍNEZ-HERRERO, R., MEJIAS, P.M., BOSCH, S. Y CARNICER, A. (2003). "Spatial width and power-content ratio of hard-edge diffracted beams", *J. Opt. Soc. Am.A*, **20**, 388-391.
- MCCUTCHEM, C.W. (1967). "Superresolution in microscopy and Abbe resolution limit", *J. Opt. Soc. Am. A*, **57**, 1190-1192.

- MEZOUARI, S. Y HARVEY, A. (2003). "Phase pupil functions for reduction of defocus and spherical aberrations", *Opt. Lett.*, **28**, 771-773.
- MIAO, J., ISHIKAWA, T., JOHNSON, B., ANDERSON, E.H., LAI, B. Y HODGSON, K.O. (2002a). "High resolution 3D x-ray diffraction microscopy", *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 088303-1-4.
- MIAO, J., OHSUNA, T., TERASAKI, O., HODGSON, K.O. Y O'KEEFE, M.A. (2002b). "Atomic resolution three-dimensional electron diffraction microscopy", *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 155502-1-4.
- MILLER, D. Y BLANKO, E. (2003). "System and method for increasing the depth of focus of the human eye", US patent 4955904.
- MILLS, J. P. Y THOMPSON, B.J. (1986). "Effect of aberrations and apodization on the performance of coherent optical-systems.1. The amplitude impulse-response", *J. Opt. Soc. Am. A*, **3**, 694-703.
- MINO, M. Y OKANO, Y. (1971). "Improvement in OTF of a defocused optical system through use of shaded apertures", *Appl. Opt.*, **10**, 2219-2225.
- MINSKY, M. (1988). "Memoir on inventing the confocal scanning microscope", *Scanning*, **10**, 128-138.
- NEIL, M.A.A., JUSKAITIS, R., WILSON, T., LACZIK, J. Y SARAFIS, V. (2000). "Optimized pupil-plane filters for confocal microscope point-spread function engineering", *Opt. Lett.*, **25**, 245-247.
- OJEDA-CASTAÑEDA, J., RAMOS, R. Y NOYOLA-ISGLEAS, A. (1988). "High focal depth by apodization and digital restoration", *Appl. Opt.*, **27**, 2583-2586.
- OJEDA-CASTAÑEDA, J., TEPICHIN, E. Y DIAZ, A. (1989). "Arbitrarily high focal depth with a quasioptimum real and positive transmittance apodizer", *Appl. Opt.*, **28**, 2666-2670.

## Referencias

---

- PARE, C. Y BELANGER, P.A. (1996). "Propagation law and quasi-invariance properties of the truncated second-order moment of a diffracted laser beam", *Opt. Commun.*, **123**, 679-693.
- PAWLEY, J. (1995). *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum, New York.
- REIHANI, S.N.S., KHALESIFARD, H.R. Y GOLESTANIAN, R. (2006). "Measuring lateral efficiency of optical traps: the effect of tube length", *Opt. Commun.*, **259**, 204-211.
- RICHARDS, B. Y WOLF, E. (1959). "Electromagnetic diffraction in optical systems.2. Structure of the image field in an aplanatic system", *Proc. Roy. Soc. London A*, **253**, 358-379.
- SALES, T.R.M. (1998). "Smallest focal spot", *Phys. Rev. Lett.*, **81**, 3844-3847.
- SAKURAI, J.J. (1985). *Modern quantum mechanics*. Addison-Wesley. Cap. 1 y 2.
- SCHOLL, M., MUFFER, S. Y POST, O. (1996). "Description of diffracted beams by weighted moments", *Proc. SPIE* , **2870**, 112-122.
- SERNA, J., MARTÍNEZ-HERRERO, R. Y MEJÍAS, P.M. (1991). "Parametric characterization of general partially coherent beams propagating through ABCD optical-systems", *J. Opt. Soc. Am. A*, **8**, 1094-1098.
- SHAEVITZ, J.W. Y FLETCHER, D.A. (2007). "Enhanced three-dimensional deconvolution microscopy using a measured depth-varying point-spread function", *J. Opt. Soc. Am. A*, **24**, 2622-2627.
- SHEPPARD, C.J.R. Y CHOUDHURY, A. (1977). "Image formation in scanning microscope", *Opt. Acta*, **24**, 1051-1073.

- 
- SHEPPARD, C.J.R. Y WILSON, T. (1981). "Effects of high angles of convergence on  $V(z)$  in the scanning acoustic microscope", *Appl. Phys. Lett.*, **38**, 858-859.
- SHEPPARD, C.J.R. (1987). "Scanning optical microscopy.", en *Advance in Optical and Electron Microscopy*, **24**, eds. Barer, R. y Cosslett, V.E. Academic, London.
- SHEPPARD, C.J.R. (1988). "Aberrations in high aperture conventional and confocal imaging systems", *Appl. Opt.*, **27**, 4782-4786.
- SHEPPARD, C.J.R. Y COGSWELL, C.J. (1991). "Effects of aberrating layers and tube length on confocal imaging properties", *Optik*, **87**, 34-38.
- SHEPPARD, C.J.R. Y GU, M. (1991). "Aberration compensation in confocal microscopy", *Appl. Opt.*, **30**, 3563-3568.
- SHEPPARD, C.J.R. Y GU, M. (1992). "Axial imaging through an aberrating layer of water in confocal microscopy", *Opt. Commun.*, **88**, 180-190.
- SHEPPARD, C.J.R. Y GU, M. (1993). "Imaging by a high aperture optical system", *J. Mod. Opt.*, **40**, 1631-1651.
- SHEPPARD, C.J.R., GU, M., BRAIN, K. Y ZHOU, H. (1994). "Influence of spherical aberration on axial imaging of confocal reflection microscopy", *Appl. Opt.*, **33**, 616-624.
- SHEPPARD, C.J.R. (1995). "Aberrations in high aperture optical systems", *Optik*, **101**, 1-5.
- SHEPPARD, C.J.R. (1999). "Binary optics and confocal imaging", *Opt. Lett.*, **24**, 505-506.
- SHERIF S. Y CATHEY T. (2003). "Depth of field control in incoherent hybrid imaging systems", en *Optical Imaging and Microscopy*, **24**, eds. Török, P. y Kao, F.J. Springer, London.

## Referencias

---

- SHERIF, S.S. Y TÖRÖK, P. (2004). "Pupil plane masks for super-resolution in high-numerical-aperture focusing", *J. Mod. Opt.*, **51**, 2007-2019.
- SIEGMAN, A.E. (1990). "New developments in laser resonators" in *Optical Resonators*, ed. D.A. Holmes. Proc. SPIE **1224**, 2-14.
- SOMALINGA, S., DRESSBACH, K., HAIN, M., STANKOVIC, S., TSCHUDI, T., KNITTEL, J. Y RICHTER, H. (2004). "Effective spherical aberration compensation by use of nematic liquid-crystal device", *Appl. Opt.*, **43**, 2722-2729.
- STALLINGA, S. (2005a). "Compact description of substrate-related aberrations in high numerical-aperture optical disk readout", *Appl. Opt.*, **44**, 849-858.
- STALLINGA, S. (2005b). "Finite conjugate spherical aberration compensation in high numerical-aperture optical disc readout", *Appl. Opt.*, **44**, 7307-7312.
- STAMNES, J.J. (1986). *Waves in focal region*. Adam Hilger.
- STELZER, E.H.K. Y LINDEK, S. (1994). "Fundamental reduction of the observation volume in far-field light-microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy", *Opt. Comm.*, **111**, 536-547.
- TEARNEY, G.J., BREZINSKI, M.E., SOUTHERN, J.F., BOUMA, B.E., HEE, M.R. Y FUJIMOTO, J.G. (1995). "Determination of the refractive-index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography", *Opt. Lett.*, **20**, 2258-2260.
- THEOFANIDOU, E., WILSON, L., HOSSAK, W.J. Y ARTL, J. (2004). "Spherical aberration correction for optical tweezers", *Opt. Commun.*, **236**, 145-150.

- TÖRÖK, P., VARGA, P., LACZIK, Z., BROKER, G.R. (1995a). "Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive-indexes: an integral-representation", *J. Opt. Soc. Am. A*, **12**, 325-332.
- TÖRÖK, P., VARGA, P. Y NÉMETH, G. (1995b). "Analytical solution of the diffraction integrals and interpretation of wave-front distortion when light is focused through a planar interface between materials of mismatched refractive-indexes", *J. Opt. Soc. Am. A*, **12**, 2660-2671.
- TÖRÖK, P., HEWLETT, S.J., Y VARGA, P. (1997). "The role of specimen-induced spherical aberration in confocal microscopy", *J. Microsc.*, **188**, 158-172.
- TÖRÖK, P. Y VARGA, P. (1997). "Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium", *Appl. Opt.*, **36**, 2305-2312.
- TÖRÖK, P. Y WILSON, T. (1997). "Rigorous theory for axial resolution in confocal microscopes", *Opt. Comm.*, **137**, 127-135.
- TÖRÖK, P. (2003). *An imaging theory for advanced, high numerical aperture optical microscopes*. Tesis Doctoral, Imperial College London.
- WATSON, G.N. (1995). *A treatise on the theory of Bessel functions*. Cambridge University Press.
- WEBER, H. (1992). "Propagation of higher-order intensity moments in quadratic-index media", *Opt. Quantum Electron.*, **24**, 1027-1049.
- WELFORD, W.T. (1960). "Use of annular apertures to increase focal depth", *J. Opt. Soc. Am.*, **50**, 749-753.
- WILSON, T Y SHEPPARD, C.R.J. (1984). *Theory and practice of optical scanning microscopy*. Academic, London.

- WILSON, T. Y CARLINI, A.R. (1988). "Three-dimensional imaging in confocal imaging-systems with finite sized detectors", J. Microsc., **149**, 51-66.
- WILSON, T. Y CARLINI, A.R. (1989). "The effect of aberrations on the axial response of confocal imaging-systems", J. Microsc., **154**, 243-256.
- WILSON, T. (1990). *Confocal microscopy*. Academic Press Limited.
- XIAO, F.R., WANG, G.Y. Y XU, Z. (2003). "Superresolution in two-color excitation fluorescence microscopy", Opt. Comm., **228**, 225-230.
- ZALEVSKY, Z., SHEMER, A., ZLOTNIK, A., BEN-ELIEZER, E. Y MAROM, E. (2006). "All-optical axial super resolving imaging using a low-frequency binary-phase mask", Opt. Exp., **14**, 2631-2643.
- ZAPATA-RODRÍGUEZ, C.J. (1999). *Estudio de la formación de imágenes tridimensionales. Desarrollo de técnicas de superresolución para sistemas confocales de barrido*. Tesis Doctoral, Universitat de València.

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

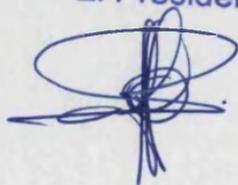
Reunit el Tribunal que

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**FACULTAT DE FÍSICA**

Reunit el Tribunal que susbscriu, en el dia de la data, acordà d'atorgar, aquesta Tesi Doctoral d'En/Na/N' *Isabel M<sup>o</sup> Escobar Garcia* la qualificació d'..... *Sobresaliente cum laude* València a ..... *4* ..... d..... *julio* ..... de 20*08*..

El President,



El Secretari,

