

**RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE  
DIFERENCIAL CON POLARIZACIÓN CIRCULAR**

**CARLOS ALBERTO CHACÓN ÁVILA**

**GRUPO DE ÓPTICA Y TRATAMIENTO DE SEÑALES  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE FÍSICA  
BUCARAMANGA  
2013**

**RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE  
DIFERENCIAL CON POLARIZACIÓN CIRCULAR**

**CARLOS ALBERTO CHACÓN ÁVILA**

**Trabajo de grado como requisito para obtener el título de magister en física**

**Director: Dr. Arturo Plata Gómez**

**GRUPO DE ÓPTICA Y TRATAMIENTO DE SEÑALES  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE FÍSICA  
BUCARAMANGA  
2013**

# AGRADECIMIENTOS

---

Este trabajo es el resultado de la investigación llevada a cabo en el grupo de óptica y tratamiento de señales de la Universidad Industrial de Santander, bajo la dirección del doctor Arturo Plata Gómez y el respaldo de todos los miembros del grupo quienes gracias a sus aportes contribuyeron enormemente con mi formación en esta área. También un agradecimiento al laboratorio de Microscopia del Parque Tecnológico de Guatiguará, a cargo del doctor Carlos Alberto Ríos el cual permitió realizara una parte importante del proceso de calibración que desarrollo en este trabajo.

# ÍNDICE GENERAL

---

INTRODUCCIÓN.....	15
<b>1. CARACTERÍSTICAS DEL MICROSCOPIO .....</b>	<b>19</b>
1.1. SISTEMA ÓPTICO .....	20
1.2. SISTEMA MECÁNICO .....	22
<b>2. MICROSCOPIA C-DIC .....</b>	<b>24</b>
2.1. BIRREFRINGENCIA.....	24
2.2. PRISMA WOLLASTON.....	29
2.2.1. Plano de Interferencia.....	33
2.2.2. Corrimiento de Fase .....	35
2.3. SISTEMA DE POLARIZACIÓN.....	36
2.4. MODELO INTERFEROMÉTRICO. ....	40
<b>3. SIMULACIÓN .....</b>	<b>43</b>
3.1. SIMULACIÓN ESFERA .....	44
3.2. MATERIALES, MUESTRAS Y RECONSTRUCCIÓN .....	46
<b>4. CALIBRACIÓN DEL SISTEMA.....</b>	<b>47</b>
4.1. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES EXPERIMENTALES.....	47
4.2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES C-DIC.....	52

<b>5. RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL</b> .....	62
5.1. INFORMACIÓN CODIFICADA EN FASE .....	62
5.1.1. PHASE SHIFTING .....	62
5.1.1.1. Algoritmo a Cuatro Imágenes.....	65
5.1.2. ALGORITMO DE INTEGRACIÓN DE ESPIRAL DE FASE .....	66
5.2. METODOLOGIA DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES PARA RECONSTRUCCIÓN .....	68
<b>CONCUSIONES</b> .....	82
<b>TRABAJOS FUTUROS</b> .....	84
<b>REFERENCIAS</b> .....	85

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Reconstrucción topográfica de un objeto mediante grado de focalización de la muestra por algoritmo de varianza. ....	16
<b>Figura 2:</b> Reconstrucción de micro-esferas mediante grado de focalización, aquí se observan defectos introducidos por la iluminación no homogénea de la muestra, A) imagen campo brillante, B) mapa de fase, C) visualización de la topografía. ...	16
<b>Figura 3:</b> Imagen C-DIC tomada con objetivo 100x del patrón de calibración con dimensiones de $5 \times 5 \mu\text{m}$ y 200 nm de profundidad. ....	17
<b>Figura 4:</b> diagrama óptico de C-DIC.....	20
<b>Figura 5:</b> sistema AxioImagerZ1 de Carl Zeiss. ....	23
<b>Figura 6:</b> indicatriz óptica de: A) un cristal isotrópico. B) un cristal anisotrópico uniaxial y C) cristal anisotrópico biaxial.....	25
<b>Figura 7:</b> frente de onda en un cristal uniáxico A) positivo B) negativo.. ....	26
<b>Figura 8:</b> orientación del frente de onda refractado para eje óptico oblicuo y A) incidencia normal a la cara del cristal, B) incidencia formando un ángulo con la normal a la cara del cristal.. ....	27
<b>Figura 9:</b> orientación del frente de onda refractado para eje óptico paralelo al plano de incidencia y A) incidencia normal a la cara del cristal, B) incidencia formando un ángulo con la normal a la cara del cristal.. ....	28
<b>Figura 10:</b> orientación del frente de onda refractado para eje el óptico perpendicular al plano de incidencia y formando un ángulo con la normal a la cara del cristal. ....	28
<b>Figura 11:</b> separación de componentes ordinaria y extraordinaria dentro del prisma Wollaston.. ....	29
<b>Figura 12:</b> A) prisma wollaston convencional B) prisma wollaston modificado. ....	30

<b>Figura 13:</b> incidencia de las componentes TE y TM en las diferentes regiones del prisma, A) región 1 fuera del prisma, región 2 dentro del prisma B) región limítrofe entre los dos cristales, C) región 3 y región 4 interna y externa del prisma.....	32
<b>Figura 14:</b> sistema óptico de un microscopio de reflexión con prisma Wollaston.	34
<b>Figura 15:</b> sistema generador de luz polarizada en microscopia C-DIC.....	36
<b>Figura 16:</b> esquema del sistema de polarización, el analizador y el polarizador están dispuestos de forma perpendicular, al igual que láminas de fase 1 y 2. ....	38
<b>Figura 17:</b> esfera utilizada para simulación. ....	44
<b>Figura 18:</b> imagen Dic de una esfera de radio unidad obtenida mediante simulación en Matlab, se observa el corrimiento del patrón de interferencia mientras se realizan cuatro corrimientos de fase (shift) controlados por el prismaWollaston. ....	45
<b>Figura 19:</b> imagen para establecer la calibración del corrimiento lateral directamente de la imagen.....	47
<b>Figura 20:</b> muestra patrón para calibración de corrimiento lateral, imagen tomada con microscopia de fuerza atómica.....	48
<b>Figura 21:</b> imagen AFM muestra estándar. ....	48
<b>Figura 22:</b> A) representación de la esfera B) corrimiento lateral $dy$ en la esfera de calibración, son conocidos el radio de la esfera y la diferencia de camino óptico en función del desplazamiento de las franjas de interferencia mencionadas en el proceso de calibración. ....	50
<b>Figura 23:</b> muestra calibración dispersión de esferas de Tin.. ....	51
<b>Figura 24:</b> imágenes SEM de la muestra utilizada para realizar la calibración, cada esfera está marcada con un número para su identificación y lleva el valor del diámetro medido con el software del equipo. ....	52
<b>Figura 25:</b> imagen C-DIC con objetivo 100x del patrón de calibración utilizado para medir el corrimiento lateral, en este se busca que la orientación del corrimiento sea paralelo a las caras superior e inferior de los huecos rectangulares.....	53

<b>Figura 26:</b> imagen perfil muestra de calibración rectángulos a partir de una imagen C-DIC tomadas con A) objetivo de 50x y B) objetivo de 100x. ....	54
<b>Figura 27:</b> A) centro de esferas ubicado mediante el procesamiento de la imagen de campo claro en Matlab B) Interferograma para calibración del shift y shear introducidos por el prisma Wollaston para un objetivo de 100x.....	56
<b>Figura 28:</b> evolución del interferograma medido en el centro de la esfera de diámetro 17,90 $\mu$ m. A) para el objetivo de 50x. B) objetivo de 100x en función de desplazamiento del prisma para los planos RGB.....	57
<b>Figura 29:</b> Interferograma de calibración del shift en el prisma Wollaston objetivo 50x, A) calibración con esfera 1, B) calibración con esfera 8.....	58
<b>Figura 30:</b> evolución del interferograma medido en el centro de cuatro esferas en función de desplazamiento del prisma para los planos RGB, se ha graficado únicamente el plano verde de cada interferograma utilizando el objetivo de 50x..	58
<b>Figura 31:</b> evolución del interferograma medido en el centro de cuatro esferas en función de desplazamiento del prisma para los planos RGB, se ha graficado únicamente el plano verde de cada interferograma utilizando el objetivo de 100x	59
<b>Figura 32:</b> curva de calibración del corrimiento lateral ( <i>shear</i> ) para el objetivo de 50x.....	60
<b>Figura 33:</b> curva de calibración del corrimiento lateral ( <i>shear</i> ) para el objetivo de 100x.....	61
<b>Figura 34:</b> función espiral de fase según el número de componentes frecuenciales presentes en la imagen. B con el doble de componentes que A.....	68
<b>Figura 35:</b> imagen 3D AFM de matriz CCD.....	69
<b>Figura 36:</b> imagen 2D y perfil de matriz CCD utilizando microscopia de fuerza atómica en modo contacto, software Veeco DI SPMLab NT ver 6.0.2.. ....	70
<b>Figura 37:</b> imagen rugosidad de superficie utilizando microscopia de fuerza atómica en modo contacto, software Veeco DI SPMLab NT ver 6.0.2. ....	71
<b>Figura 38:</b> imágenes con rotación acimutal y dirección de corrimiento lateral ( <i>shear</i> ) mutuamente perpendicular. A) 45 grados, B) – 45 grados.....	72

<b>Figura 39:</b> imágenes obtenidas después de aplicar <i>phase shifting</i> con algoritmo a cuatro imágenes en dos direcciones de corrimiento lateral ( <i>shear</i> ) mutuamente perpendicular. A) 45 grados, B) – 45 grados.....	73
<b>Figura 40:</b> muestra reconstruida. A) fase obtenida a partir de algoritmo de integración de fase en espiral, B) topografía de la CCD obtenida con base en la fase y la calibración del sistema óptico, visualización 3D en Matlab.....	74
<b>Figura 41:</b> Perfiles obtenidos a partir de la reconstrucción de micro-lentes con forma de elipse en la base A) perfil tomado en la dirección del semieje mayor, B) perfil tomado en la dirección del semieje menor de las micro-lentes.....	75
<b>Figura 42:</b> reconstrucción de micro-lentes de 1.58 $\mu\text{m}$ por algoritmo de focalización con criterio de varianza, visualización 3D realizada en Image J. ....	75
<b>Figura 43:</b> imagen de una dispersión de esferas de Estaño A) modo campo claro B) modo C-DIC, la muestra está en foco sobre la parte superior de las esferas con diámetro cercano a 9 $\mu\text{m}$ , algunas de las esferas en esta región de la muestra están deformadas por defectos en su fabricación, la imagen fue tomada con un objetivo de 100x.....	77
<b>Figura 44:</b> A) fase a partir de algoritmo de integración de fase en espiral con unidades de la imagen en pixeles, B) topografía obtenida de la dispersión de esferas, las unidades corresponden a micrómetros.....	78
<b>Figura 45:</b> bi-prisma de Fresnel con recubrimiento de oro de aproximadamente 50 nm de espesor.....	79
<b>Figura 46:</b> A) imagen del bi-prisma de Fresnel, tomada en modo de campo claro y con un objetivo de 100x, B) imágenes de <i>phase shifting</i> utilizadas para construir la función compleja, base del algoritmo de integración de fase en espiral. ....	80
<b>Figura 47:</b> fase obtenida a partir de <i>phase shifting</i> e integración de fase en espiral y su correspondiente perfil.....	81
<b>Figura 48:</b> reconstrucción obtenida de la parte superior del bi-prisma de Fresnel, con ángulo entre los dos planos de 176 grados.....	81

# ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1:</b> cálculo de la resolución lateral y axial para objetivos de 5x, 20x, 50x, 100x.....	21
<b>Tabla 2:</b> valores para calibración corrimiento lateral con objetivo de 50x. ....	54
<b>Tabla 3:</b> valores para calibración corrimiento lateral con objetivo de 100x. ....	55
<b>Tabla 4:</b> valores del corrimiento del pico de máximo de intensidad medidas respecto al centro de cada esfera, para siete esferas observadas con objetivo de 50x.....	59
<b>Tabla 5:</b> valores del corrimiento del pico de máximo de intensidad medidas respecto al centro de cada esfera, para seis esferas observadas con objetivo de 100x.....	60

# RESUMEN

---

**TÍTULO:** RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DIFERENCIAL CON POLARIZACIÓN CIRCULAR<sup>1</sup>

**AUTOR:** CHACÓN ÁVILA, Carlos Alberto.<sup>2</sup>

**PALABRAS CLAVES:** Microscopia C-DIC, *Phase shifting*, Integración de fase en espiral, prisma Wollaston.

**RESUMEN:**

Este trabajo está encaminado a analizar un procedimiento para extraer la información tridimensional de una muestra observada a través del microscopio a partir del procesamiento de imágenes obtenidas con microscopia de interferencia de contraste diferencial con polarización circular, técnica conocida como C-DIC y del análisis de los principios ópticos de la técnica. Una imagen C-DIC contiene información de intensidad y gradientes de fase asociados a la muestra, este efecto es debido en primer lugar a la división del frente de onda por un prisma Wollaston en dos frentes plano-polarizados con corrimiento lateral constante muy pequeño en todo el espacio y en segundo lugar al desfase introducido tanto por el prisma como por la muestra. Como se resalta, el fenómeno de interferencia conduce a variaciones no lineales de la intensidad asociadas a los gradientes de fase en la dirección del corrimiento lateral. La contribución hecha por el fenómeno de polarización circular hace que la distribución de intensidad no presente dependencia con la rotación del prisma Wollaston como ocurriría en la clásica microscopia DIC, permitiendo que el prisma pueda ser rotado sin introducir variaciones en la intensidad de la imagen. Siguiendo este modelo y en función del proceso de calibración obtenido con una muestra patrón se busca recuperar la información tridimensional de una muestra homogénea obteniendo la fase a partir de imágenes C-DIC con corrimiento lateral perpendicular, para esto se hace uso de herramientas como *phase shifting* e integración de fase en espiral. Los resultados son comparados con la información de topografía obtenida por microscopia de fuerza atómica, finalmente se presentan las ventajas y desventajas del uso de esta técnica.

---

<sup>1</sup> Proyecto de Grado

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Director: PhD. Arturo Plata Gómez.

# ABSTRACT

---

**TITLE:** THREE DIMENSIONAL RECONSTRUCTION USING CIRCULAR-DIFFERENTIAL INTERFERENCE CONTRAST MICROSCOPY.<sup>3</sup>

**AUTHOR:** CHACÓN ÁVILA, Carlos Alberto.<sup>4</sup>

**KEY WORDS:** Circular polarized light – Differential interference contrast, Phase shifting Spiral phase integration, Wollaston prism.

**ABSTRACT:**

This work is aimed to examine a process for extracting three-dimensional information, from a sample observed through the microscope. The images obtained by differential interference contrast microscopy with circular polarization, technique known as C-DIC, were processed and analyzed using optical principles. A C-DIC image contains intensity and phase gradients information associated to the sample. This effect is due firstly, to the wavefront division using a Wollaston prism into two plane-polarized fronts, which are separated by a very small distance; and secondly, to the dephasing introduced by the prism and the sample. It is shown that the interference phenomenon leads to non-linear variations of the intensity associated to the phase gradients in the wavefront's separation direction. The contribution made by the circular polarization phenomenon, causes that the intensity distribution presents no dependence on the Wollaston prism rotation, as it would occur in the classical DIC microscopy, allowing the prism to be rotated without introducing variations in the image intensity. Following this model and calibration function obtained with a standard sample, it's possible to retrieve the three-dimensional information from a homogeneous sample, getting the phase from two C-DIC images with a perpendicular lateral separation. To achieve this, tools like Phase shifting and Phase spiral integration are used. The results are compared to the topography information acquired by Atomic Force Microscopy. At the end, advantages and disadvantages of using this technique are presented.

---

<sup>3</sup> Degree Project.

<sup>4</sup> Faculty of Sciences. School of Physics. Director: PhD. Arturo Plata Gómez.

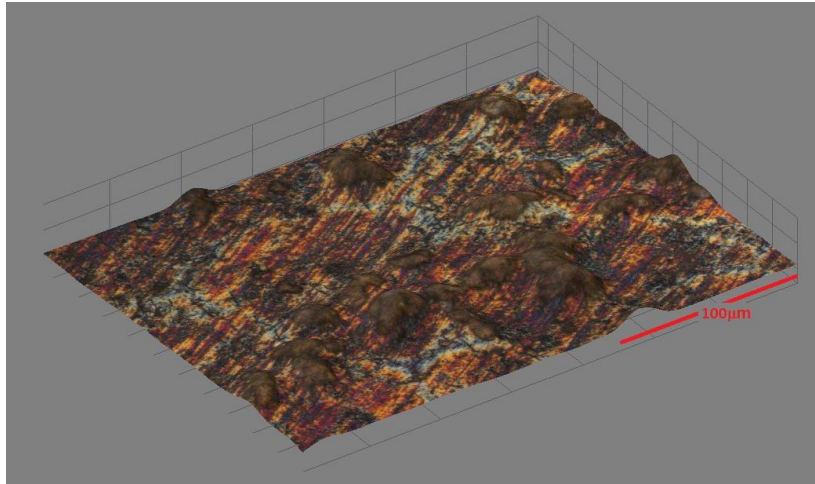
# INTRODUCCIÓN

---

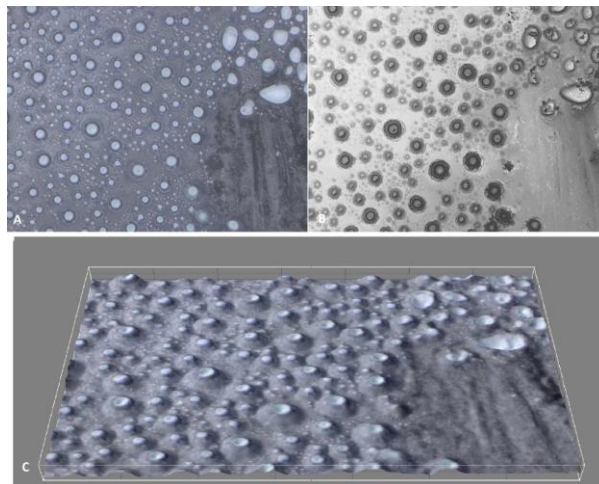
Las técnicas de recuperación de topografía adquieren gran importancia en el análisis, seguimiento y control en aplicaciones de materiales ya que permiten establecer parámetros asociados al estado de superficie, tamaño de grano y homogeneidad entre otros. Los métodos empleados actualmente son diversos, sin embargo uno de ellos no puede por sí solo resolver las diferentes dificultades que se presentan ya sean debidas al tipo de material o a la escala en que deba observarse la muestra.

Actualmente en la UIS se ha venido trabajando con técnicas de recuperación de topografía a escala micrométrica con la ayuda de microscopios ópticos [21], basándose en establecer el grado de focalización de la imagen (Figura 1) o en determinar variaciones de fase directamente de un patrón interferométrico generado por el objeto. Sin embargo se siguen buscando herramientas que permitan ampliar la capacidad de cada técnica, así por ejemplo las limitaciones más comunes encontradas en los algoritmos basados en la posición de mejor foco están asociados a los límites generados por la profundidad de campo del objetivo empleado, a la no homogeneidad en la iluminación (Figura 2) a las aberraciones del sistema óptico y al ruido introducido por la cámara; mientras que en los interferométricos las dificultades pueden estar asociadas con el tipo de muestra ya que esta debe ser altamente reflectiva, a los cambios bruscos en la topografía que conducen a errores en la recuperación de la fase. Los trabajos realizados con las técnicas de microscopia de contraste de fase [4, 8, 9] sugieren la posibilidad de emplearla como herramienta para recuperar variaciones de fase ya sean originadas por la topografía, por cambios en el índice de refracción del material o

la combinación de estos dos parámetros, sin embargo este trabajo está dirigido a buscar solución al primero de estos retos, es decir a recuperar variaciones de fase originadas por la topografía.

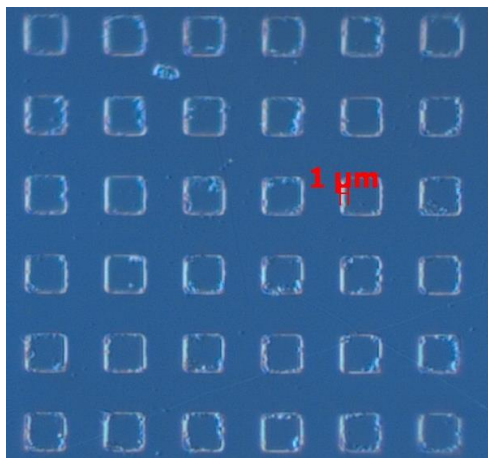


**Figura 1:** Reconstrucción topográfica de un objeto mediante grado de focalización de la muestra por algoritmo de varianza. *Fuente: autor.*



**Figura 2:** Reconstrucción de micro-esferas mediante grado de focalización, aquí se observan defectos introducidos por la iluminación no homogénea de la muestra, **A)** imagen campo brillante, **B)** mapa de fase, **C)** visualización de la topografía. *Fuente: autor.*

Las imágenes obtenidas con microscopía DIC son comúnmente conocidas porque presentan un efecto de sombra que acentúa o realza características de la muestra asociadas a las variaciones en topografía o a los cambios en el índice de refracción del medio, produciendo la sensación de tridimensionalidad en la imagen (Figura 3). Desde hace varios años se busca emplear esta sensación de tridimensionalidad de la imagen para recuperar ya sean características ópticas del material o información de la topografía analizando el fenómeno óptico que la produce [19].



**Figura 3:** Imagen C-DIC tomada con objetivo 100x del patrón de calibración con dimensiones de  $5 \times 5 \mu\text{m}$  y  $200 \text{ nm}$  de profundidad. *Fuente: autor.*

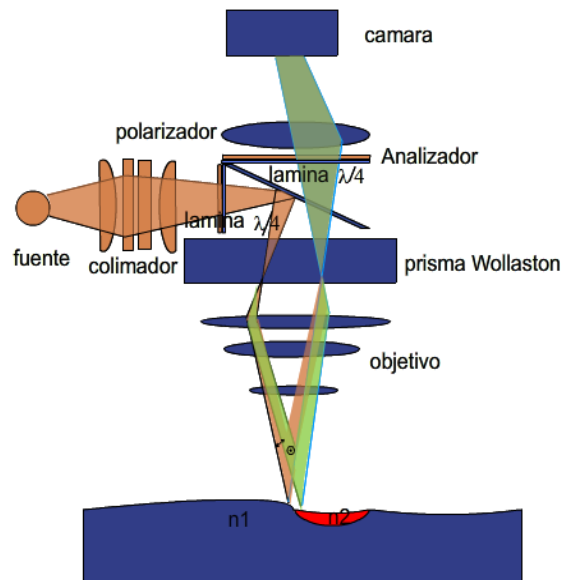
La principal motivación de este trabajo es debida a la capacidad de la técnica para observar pequeños cambios en la topografía cercanos a la longitud de onda (figura 3) y por otra parte a que permite analizar distintos tipos de muestra ya sea que posean o no alta reflexión, formulando así una alternativa y solución a los problemas encontrados en otros métodos actualmente utilizados; De esta forma la metodología del trabajo está encaminado en la primera parte a describir las características del sistema óptico del microscopio utilizado para obtener imágenes C-DIC, en la segunda parte a estudiar el proceso de formación de las imágenes C-DIC, en la tercera parte a comprobar mediante la simulación una aproximación del

principio óptico, en la cuarta parte se describe el proceso de calibración del sistema óptico y se especifica el tipo de muestra que se emplea para la posterior reconstrucción, en la quinta parte se muestra el método empleado para desarrollar este trabajo basado en el principio óptico descrito en los capítulos anteriores, se muestran los resultados obtenidos y finalmente se realiza la discusión de resultados presentando las conclusiones y observaciones.

# 1. CARACTERÍSTICAS DEL MICROSCOPIO

---

La microscopía C-DIC es una forma de microscopía de contraste de fase también conocida como microscopía Nomarski, desarrollada hace más de 50 años (Nomarski y Weill 1955). Es un tipo de microscopía interferométrica donde la interferencia es obtenida mediante la separación de la luz en dos componentes desplazadas lateralmente (*shear*) una distancia del orden de la longitud de onda usada y una fase adicional (*shift*) puede ser introducida en uno de los dos haces, tanto el desplazamiento como la fase adicional son producidos por un prisma de material birrefringente; en microscopía de transmisión las dos componentes, una vez pasan a través de la muestra, son recombinadas mediante un segundo prisma invirtiendo el proceso; en microscopía de reflexión, una vez la luz incide sobre la muestra, es reflejada y a su regreso pasa nuevamente por el mismo prisma invirtiendo el proceso (Figura 4), en cualquiera de los casos al recombinar las dos componentes, las diferencias de fase producidas por el camino óptico y propiedades ópticas del material producen una modulación de la amplitud de la onda de salida y por consiguiente de la intensidad de la imagen.



**Figura 4:** diagrama óptico de C-DIC. *Fuente: autor.*

Para el desarrollo de este trabajo fue empleado un microscopio de reflexión para materiales Axio Imager.Z1m de la empresa Carl Zeiss con iluminación Kohler, óptica al infinito libre de esfuerzos, corrección cromática y diseñada para aplicaciones en microscopia de contraste de fase C-DIC.

## 1.1. SISTEMA ÓPTICO

El microscopio Axio Imager.Z1m cuenta con objetivos tipo Epiplan-Neofluar con aumentos de 10X-20X-50X-100X, módulos de campo claro, C-DIC (*circular-diferencial interferometer contrast*) y TIC (*total interferometer contrast*). Las características de los objetivos son mostradas en la tabla 1 para cada magnificación.

**Tabla 1:** cálculo de la resolución lateral y axial para objetivos de 5x, 20x, 50x, 100x. *Fuente: autor.*

OBJETIVO	5X	20X	50X	100X
APERTURA NUMÉRICA	0,13	0,5	0,8	0,9
RESOLUCIÓN LATERAL	2,34 $\mu\text{m}$	0,61 $\mu\text{m}$	0,38 $\mu\text{m}$	0,33 $\mu\text{m}$
RESOLUCIÓN AXIAL	29,58 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$	0,78 $\mu\text{m}$	0,61 $\mu\text{m}$

Las resoluciones lateral y axial fueron calculadas utilizando las siguientes expresiones:

Para resolución lateral [1]:

$$R = \frac{K\lambda}{2NA} \quad \text{con } NA_{obj} + NA_{c_{iluminación}} = 2NA \quad (\text{para máxima resolución}) \quad (1.1)$$

Y resolución axial dada por:

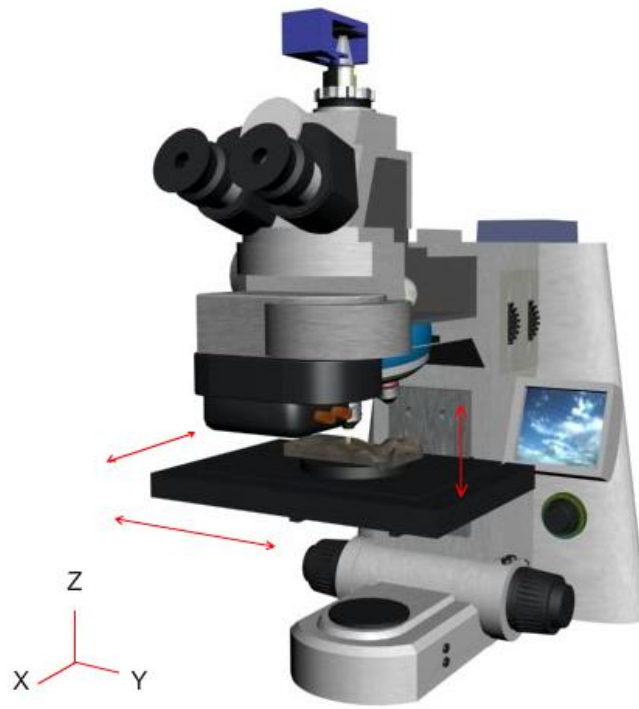
$$R = \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (1.2)$$

Donde R representa la resolución, NA la apertura numérica, los parámetros asignados para longitud de onda e índice de refracción en las ecuaciones anteriores son:

$$\lambda = 0.5\mu\text{m}, n = 1 \text{ (aire)}, K = 1.22 \text{ aproximación Rayleigh} \quad (1.3)$$

## 1.2. SISTEMA MECÁNICO

Las características mecánicas más importantes radican en los desplazamientos que el microscopio Carl Zeiss puede realizar para hacer un barrido sobre la muestra (Figura 5), gracias a que cuenta con una platina con actuadores piezoeléctricos tanto a lo largo del eje óptico (dirección Z) como en los ejes transversales (direcciones X-Y). El máximo desplazamiento X-Y de la platina es de 85mm y 130mm respectivamente, con paso de 200 nm y desplazamiento en Z de 120 mm a pasos de 10 nm.



**Figura 5:** sistema AxiomagerZ1 de Carl Zeiss. *Fuente: autor.*

## 2. MICROSCOPIA C-DIC

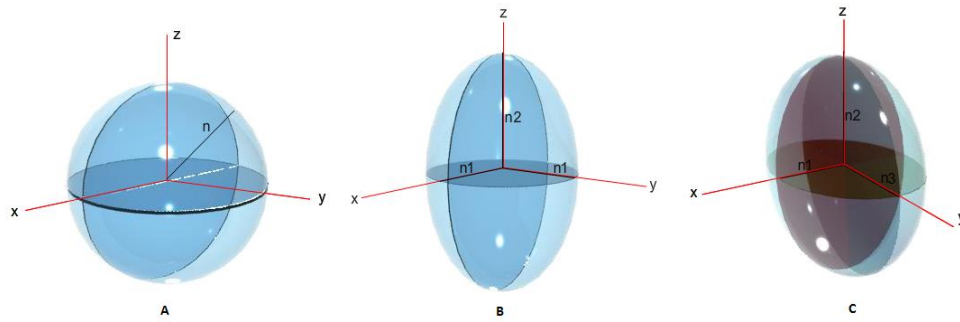
---

### 2.1. BIRREFRINGENCIA

El principio básico de la microscopia de contraste de fase y por consiguiente de la microscopia DIC y C-DIC es un prisma hecho de un material birrefringente, de allí radica la importancia de establecer cuál es el comportamiento de la luz al incidir sobre un material de este tipo.

En algunos cristales el medio de propagación tiene propiedades ópticas isotrópicas lo que significa que el índice de refracción no depende de la dirección de propagación de la luz en el medio, por lo tanto, cuando la luz se propaga a través de ellos lo hace a igual velocidad en todas las direcciones, sin embargo en otros cristales las propiedades físicas del material que lo componen varían con la dirección y estos se denominan anisotrópicos.

En óptica cristalina se utiliza una superficie de referencia llamada indicatriz óptica que ayuda a visualizar geoméricamente la variaciones del índice de refracción en un material transparente, así por ejemplo si la indicatriz óptica para un material isotrópico (Figura 6A) es una esfera, indica que en todas las direcciones el índice de refracción es el mismo, mientras que un medio birrefringente está representado por un elipsoide tridimensional que definen dos o tres índices de difracción diferentes (Figura 6B y 6C).

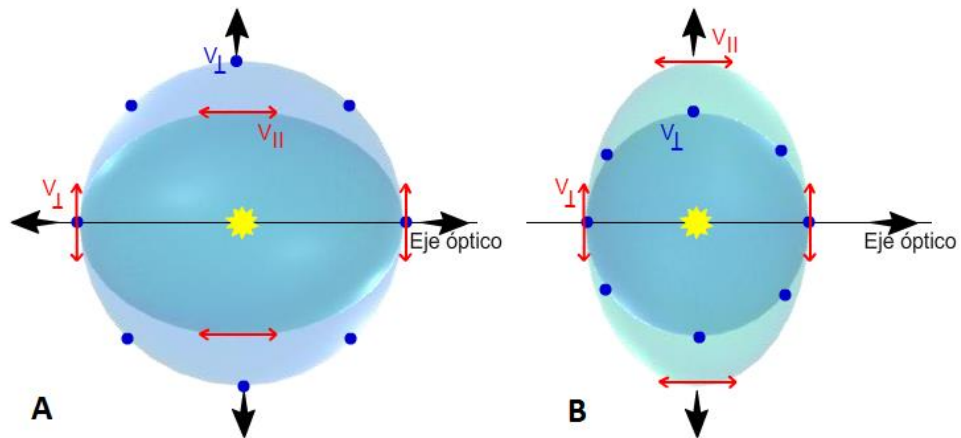


**Figura 6:** indicatriz óptica de: **A)** un cristal isotrópico. **B)** un cristal anisotrópico uniaxial y **C)** cristal anisotrópico biaxial. *Fuente: autor.*

Los cristales anisotrópicos tienen distintos ejes cristalográficos y tienen un índice de refracción que varía con la dirección de propagación de la luz en el material, cuando la luz incide por el eje óptico de este tipo de cristales actúa de manera similar a cuando pasa por un cristal isotrópico, moviéndose a través de él con una sola velocidad; cuando la luz incide en cualquier otra dirección, es refractada en dos ondas cada una polarizada con direcciones de vibración del campo eléctrico formando un ángulo recto y además viajando con diferente velocidad, este fenómeno se conoce como doble refracción o birrefringencia.

En la clasificación óptica de cristales podemos establecer dos tipos diferentes según sea la relación entre los índices de refracción esto es, cristales uniáxicos y biáxicos [2]. En los cristales uniáxicos los átomos que forman el cristal están distribuidos simétricamente en una sola dirección, por este motivo solo se tiene una dirección a lo largo de la cual no se produce birrefringencia [2], por lo tanto la luz que incide sobre el cristal en dirección distinta al eje óptico producirá dos ondas, una onda esférica (conocida como onda ordinaria) que se caracteriza por su campo eléctrico normal al eje óptico y su propagación en todas direcciones con la misma velocidad llamada aquí  $V_{\perp}$  y otra onda elipsoidal donde el campo eléctrico puede ir desde perpendicular hasta paralelo respecto al eje óptico

dependiendo de la dirección de propagación (llamada onda extraordinaria), esta onda tiene la misma velocidad que la onda ordinaria  $V_{\perp}$  solo en la dirección del eje óptico y tiene una velocidad  $V_{\parallel}$  en la dirección perpendicular a este; estas dos velocidades definen los dos índices principales de refracción que identifican a este tipo de cristal  $n_o = C/V_{\perp}$  y  $n_e = C/V_{\parallel}$ . Si la velocidad de  $V_{\perp}$  es mayor que  $V_{\parallel}$  el cristal es llamado uniaxial positivo (Figura 7A), por el contrario cuando la velocidad  $V_{\parallel}$  es mayor que  $V_{\perp}$  el cristal es llamado uniaxial negativo (Figura 7B). Los cristales biaxiales poseen dos ejes ópticos en los cuales la velocidad de propagación es la misma presentándose en las demás direcciones birrefringencia (Figura 6C).

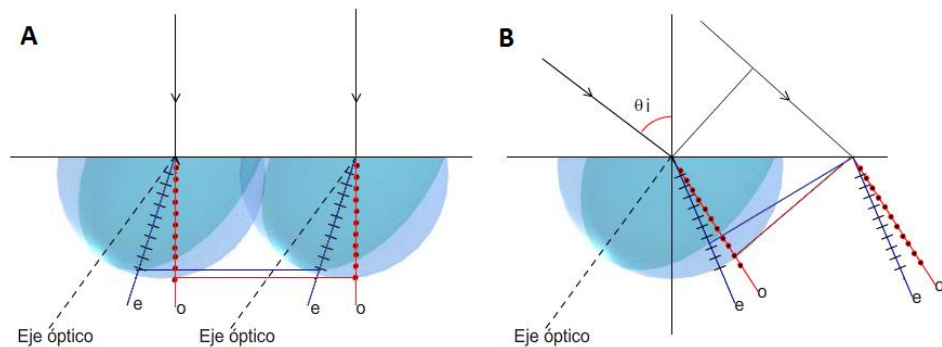


**Figura 7:** frente de onda en un cristal uniaxial **A)** positivo **B)** negativo. *Fuente:* autor.

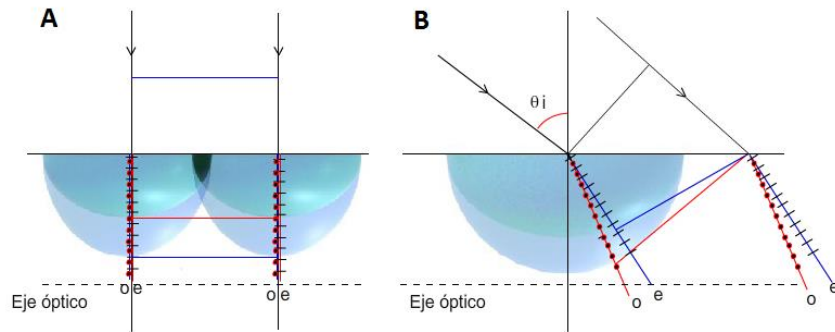
Dependiendo del corte del cristal y la orientación de las caras del mismo respecto al eje óptico se consigue que las ondas ordinaria y extraordinaria sigan una trayectoria definida; las figuras 8(A), 8(B), 9(A), 9(B) y 10 muestran la trayectoria de los frentes de onda ordinaria y extraordinaria según la orientación del cristal respecto a la dirección de la luz incidente; para un cristal positivo el campo

eléctrico de la onda ordinaria siempre esta polarizado en la dirección perpendicular al eje óptico del cristal definiendo la polarización de salida.

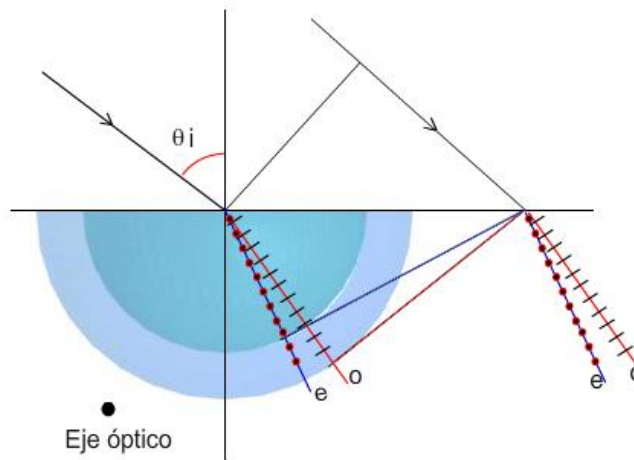
Como se mencionó anteriormente, cuando la luz natural incide sobre un material birrefringente en cualquier dirección distinta del eje óptico se producen dos ondas, una llamada ordinaria y otra extraordinaria (Figura 11) sin embargo cuando provienen de una fuente de luz natural no polarizada las distintas componentes no presentan coherencia entre sí y por lo tanto aunque se consiga que vibren en el mismo plano de polarización no logran interferir, por otro lado si las ondas ordinaria y extraordinaria provienen de la misma onda linealmente polarizada o circularmente polarizada entonces presentarán un grado de coherencia y por lo tanto puede interferir cuando se encuentran en el mismo plano. Por tal motivo la microscopia de contraste de fase se basa en este principio, requiriendo la presencia de iluminación con luz polarizada [3].



**Figura 8:** orientación del frente de onda refractado para eje óptico oblicuo y **A)** incidencia normal a la cara del cristal, **B)** incidencia formando un ángulo con la normal a la cara del cristal. *Fuente: autor.*

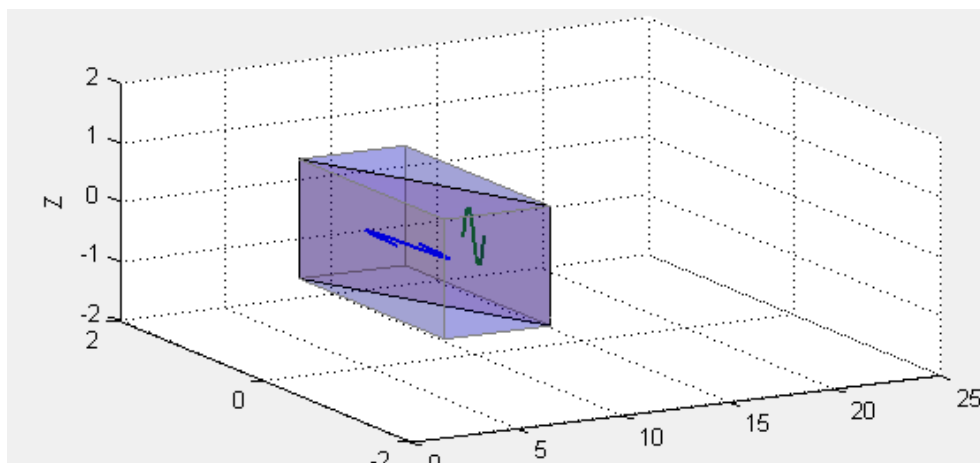


**Figura 9:** orientación del frente de onda refractado para eje óptico paralelo al plano de incidencia y **A)** incidencia normal a la cara del cristal, **B)** incidencia formando un ángulo con la normal a la cara del cristal. *Fuente: autor.*



**Figura 10:** orientación del frente de onda refractado para eje el óptico perpendicular al plano de incidencia y formando un ángulo con la normal a la cara del cristal. *Fuente: autor.*

En la sección 1.3 se muestra que la separación final de estos frentes de onda está relacionada con los índices de refracción ordinario y extraordinario del prisma y con la orientación de su eje óptico.



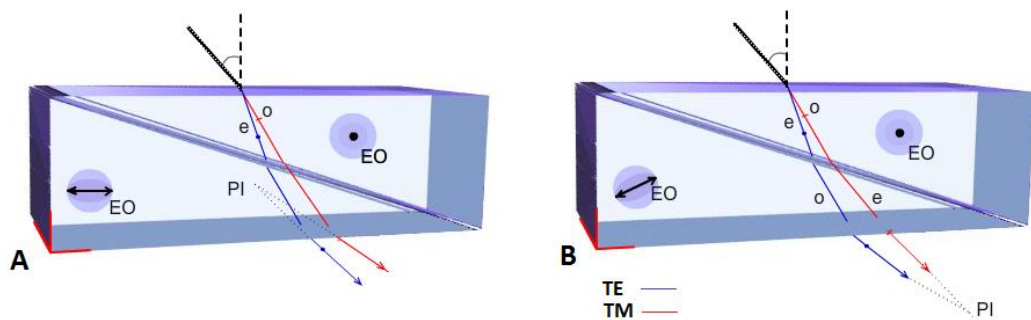
**Figura 11:** separación de componentes ordinaria y extraordinaria dentro del prisma Wollaston. *Fuente: autor.*

## 2.2. PRISMA WOLLASTON

Un prisma Wollaston es construido de dos cristales birefringentes uniaxiales de calcita o cuarzo cortados en ángulo y unidos formando una placa plano paralela. Cuando sus ejes ópticos forman un ángulo recto entre sí y además son paralelos a las caras de entrada y salida del cristal, el prisma recibe el nombre de prisma Wollaston convencional PWC (Figura 12A). Cuando se cambia la orientación de alguno de los ejes del cristal dejando de ser paralelo a las caras de entrada y salida recibe el nombre de Wollaston modificado PWM. (Figura 12B), presentando este último mayor interés ya que la microscopia C-DIC funciona con un prisma de este tipo [4].

El efecto neto de un prisma Wollaston es separar la iluminación incidente en dos ondas propagándose en diferentes direcciones con una separación angular muy pequeña conocida como desplazamiento angular del Wollaston (*shear*), la cual

depende del ángulo formado por los prismas y del índice de refracción ordinario y extraordinario de los mismos; la principal diferencia entre un prisma convencional y uno modificado radica en que a la salida de un prisma Wollaston Convencional los frentes de onda ordinario y extraordinario divergen y por lo tanto se intersecan sus proyecciones en un plano dentro del prisma llamado plano de intersección o plano de aparente separación (figura 12A), mientras en el prisma Modificado los frentes de onda convergen e intersecan fuera de este, cerca de la cara de salida del prisma (figura 12B) donde posteriormente será ubicado el foco anterior del objetivo del sistema óptico.



**Figura 12: A) prisma wollaston convencional B) prisma wollaston modificado.**

*Fuente: autor.*

Como en el primer segmento del prisma la onda es dividida en dos ondas (fig13A) con polarización mutuamente perpendicular [5], la onda extraordinaria corresponderá a aquella cuyo campo eléctrico esta polarizado a lo largo del eje óptico, aquí llamada onda TE (transversal eléctrica), la otra será la onda ordinaria, donde el campo magnético estará polarizado en la dirección del eje óptico y será llamada onda TM (transversal magnética). Al incidir sobre el segundo segmento de cristal la onda TE pasa a ser ordinaria debido a la nueva disposición del eje óptico

cristalino (Figura 13.B) y en contra-posición la TM pasará a ser extraordinaria, en esta región del prisma el índice de refracción para la onda ordinaria no dependerá de la dirección y por lo tanto TE viaja en todas direcciones con la misma velocidad mientras que para la onda extraordinaria, en este lado del prisma TM, el índice dependerá del ángulo  $\theta$  formado entre la dirección de propagación de TM con el eje óptico y de los índices ordinario y extraordinario del material tomando valores desde  $n_o$  hasta  $n_e$ .

$$n_e(\theta) = \frac{n_o n_e}{n_o^2 \sin^2 \theta + n_e^2 \cos^2 \theta} \quad (2.1)$$

Donde  $n_o$  y  $n_e$  son el índice de refracción ordinario y extraordinario respectivamente. Considerando la incidencia normal sobre la cara de entrada del prisma y aplicando la ley de Snell en cada interfaz es posible seguir la propagación del haz que representa cada frente de onda en la región 4 fuera del prisma (figura 13C) y observar que se produce un desplazamiento angular dado por:

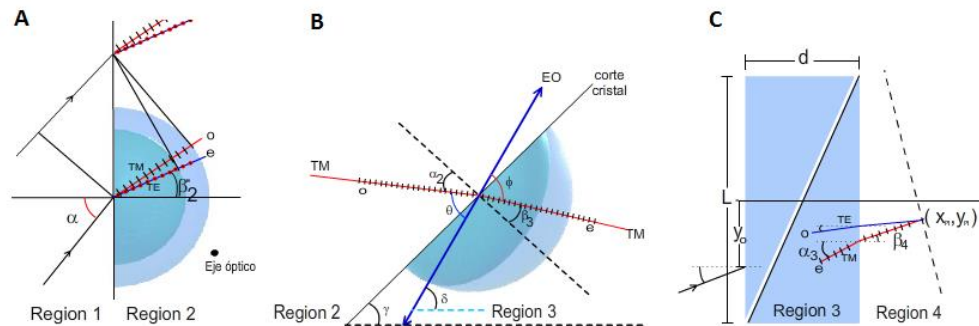
$$\Delta\beta = \beta_4^{TM} - \beta_4^{TE} \quad (2.2)$$

Siendo  $\beta_4$  el ángulo que forma la dirección de propagación de la onda TE y la TM a la salida del prisma (figura 13C). En este caso se sigue que:

$$\beta_4^{TE} = -\sin^{-1} \left\{ \frac{n_o}{n_f} \cos \left[ \sin^{-1} \left( \frac{n_e}{n_o} \cos \gamma \right) + \gamma \right] \right\}$$

$$\beta_4^{TM} = -\sin^{-1} \left\{ \frac{n_e(\theta)}{n_f} \cos \left[ \sin^{-1} \left( \frac{n_e}{n_e(\theta)} \cos \gamma \right) + \gamma \right] \right\} \quad (2.3)$$

Siendo  $n_f$  el índice de refracción fuera del prisma y  $\gamma$  el ángulo formado por el eje óptico con respecto a una de las caras del prisma (figura 13C), como se observa en la ecuación 2.3, el desplazamiento angular depende de los índices de refracción del material y de la orientación del eje óptico.



**Figura 13:** incidencia de las componentes TE y TM en las diferentes regiones del prisma, **A)** región 1 fuera del prisma, región 2 dentro del prisma **B)** región limítrofe entre los dos cristales, **C)** región 3 y región 4 interna y externa del prisma. *Fuente: autor.*

## 2.2.1. Plano de Interferencia

Las ondas ortogonalmente polarizadas intersecan en un plano que puede estar dentro o fuera del prisma, es decir este plano puede ser real o virtual dependiendo si la intersección se produce a la salida del prisma o dentro del prisma (figura 13C). En microscopia C-DIC se busca que este plano coincida con el plano focal del objetivo del microscopio. La ecuación que define la posición de un punto de intersección entre dos rayos que representan la dirección de propagación de los frentes de onda se puede determinar geoméricamente a partir de la propagación de dos rayos que atraviesan el prisma (Ec2.7 – Ec2.8) hasta interceptarse en un punto  $(X_{PI}, Y_{PI})$ , de esta forma es posible definir la recta que representa la ubicación del plano de interferencia de las ondas a la salida del prisma [5].

$$\begin{aligned} y_2^{TE} &= \tan \beta_2^{TE} x_2^{TE} + y_0 \\ \underbrace{y_2^{TM} &= \tan \beta_2^{TM} x_2^{TM} + y_0}_{\text{región(1-2)}} \end{aligned} \quad (2.4)$$

$$\begin{aligned} y_3^{TE} &= (x_3^{TE} - x_{23}^{TE}) \tan \alpha_3^{TE} + y_{23}^{TE} \\ \underbrace{y_3^{TM} &= (x_3^{TM} - x_{23}^{TM}) \tan \alpha_3^{TM} + y_{23}^{TM}}_{\text{región(2-3)}} \end{aligned} \quad (2.5)$$

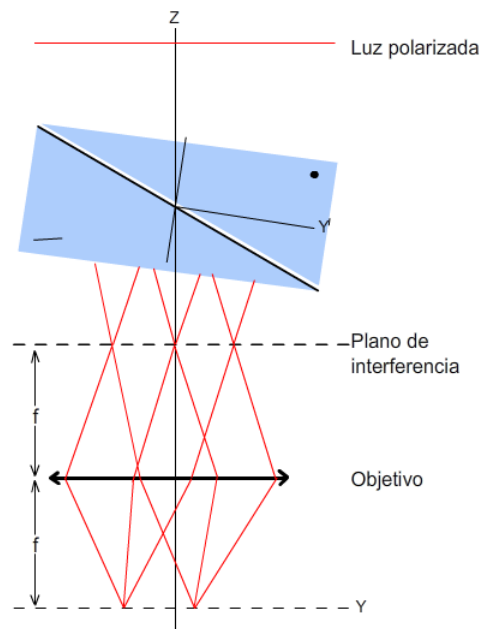
$$\begin{aligned} y_4^{TE} &= (x_4^{TE} - d) \tan \beta_4^{TE} + y_{34}^{TE} \\ \underbrace{y_4^{TM} &= (x_4^{TM} - d) \tan \beta_4^{TM} + y_{34}^{TM}}_{\text{región(3-4)}} \end{aligned} \quad (2.6)$$

Con  $d$  como espesor del prisma.

$$X_{PI} = \frac{Y_{34}^{TM} - Y_{34}^{TE}}{\tan \beta_4^{TE} - \tan \beta_4^{TM}} + d \quad (2.7)$$

$$Y_{PI} = (Y_{34}^{TM} - Y_{34}^{TE}) \frac{\tan \beta_4^{TE}}{\tan \beta_4^{TE} - \tan \beta_4^{TM}} + Y_{34}^{TE} \quad (2.8)$$

Al tomar diferentes valores de  $y_0$  desde  $-L/2$  a  $L/2$  y solucionando el sistema de ecuaciones anterior es posible encontrar la recta que define la región del espacio donde interfieren los dos frentes de onda llamado plano de interferencia, el cual no resulta ser paralelo a la cara de salida del prisma (figura 14) haciendo necesario rotar el prisma para que este plano sea perpendicular al eje óptico del sistema.



**Figura 14:** sistema óptico de un microscopio de reflexión con prisma Wollaston.

*Fuente: autor.*

## 2.2.2. Corrimiento de Fase

Entre los frentes de onda ordinaria y extraordinaria se produce un corrimiento de fase (Ec 2.9) relacionado directamente con las diferencias de camino óptico  $\Delta s$  dentro del prisma y al índice de refracción del medio por donde se propagan, este corrimiento es una función lineal de la posición  $y_o$  (Ec 2.13) a lo largo de la cara de entrada en el prisma [1.1] indicando que es posible cambiar la fase introducida por el prisma moviendo este en dirección perpendicular al eje óptico del sistema.

$$\phi = \frac{2\pi\Delta s}{\lambda} \quad (2.9)$$

$$\Delta s = S^{TM} - S^{TE} \quad (2.10)$$

$$\begin{aligned} S^{TE} &= n_e \left[ (x_{23}^{TE})^2 + (y_{23}^{TE} - y_0)^2 \right]^{1/2} + n_o \left[ (d - x_{23}^{TE})^2 + (y_{34}^{TE} - y_{23}^{TE})^2 \right]^{1/2} + n_1 \left[ (x_{pl} - d)^2 + (y_{pl} - y_{34}^{TE})^2 \right]^{1/2} \\ S^{TM} &= n_e \left[ (x_{23}^{TM})^2 + (y_{23}^{TM} - y_0)^2 \right]^{1/2} + n_e(\theta_e) \left[ (d - x_{23}^{TM})^2 + (y_{34}^{TM} - y_{23}^{TM})^2 \right]^{1/2} + n_1 \left[ (x_{pl} - d)^2 + (y_{pl} - y_{34}^{TM})^2 \right]^{1/2} \end{aligned} \quad (2.11)$$

Para pequeños ángulos de incidencia esto puede ser aproximado a:

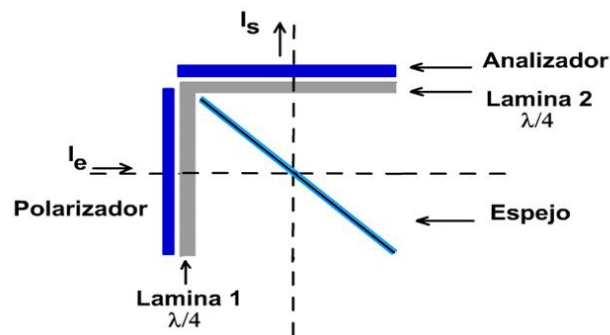
$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\beta \cdot y_o = \frac{2\pi}{\lambda} R_p \quad (2.12)$$

$$R_p = \Delta\beta y_o \quad (2.13)$$

Llamando a  $R_p$  al retardo producido por el prisma,  $y_0$  la coordenada Y del haz incidente en la entrada del prisma y  $\Delta\beta$  el ángulo de separación entre las dos ondas a la salida del prisma [5].

### 2.3. SISTEMA DE POLARIZACIÓN

El microscopio consta de un módulo reflector C-DIC formado por un polarizador, una lámina  $\lambda/4$  para la generar luz polarizada circularmente, una lámina semi-reflectora (Figura 15), una segunda lámina  $\lambda/4$  y finalmente un analizador a la salida del sistema óptico [4].



**Figura 15:** sistema generador de luz polarizada en microscopia C-DIC. *Fuente:* autor.

El cambio del estado de polarización de la onda incidente a la salida del sistema es el producto de la interacción de la luz con la sucesión de elementos ópticos por

los que se trasmite [6], la ecuación que describe la transferencia de intensidad del arreglo óptico puede ser obtenida mediante las matrices de Jones [Ec 2.14].

$$E_t = M_n M_{(n-1)} \dots M_2 M_1 E_i \quad (2.14)$$

Donde M representa las matrices de Jones de los diferentes elementos ópticos y el subíndice n está asociado al último elemento por el que se propaga la onda incidente en este caso corresponde al analizador, de esta forma las matrices del analizador y polarizador están dadas por:

$$M_P = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \quad M_A = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (2.15)$$

La matriz de rotación, utilizada para la orientación del analizador, polarizador y eje del prisma (figura 17).

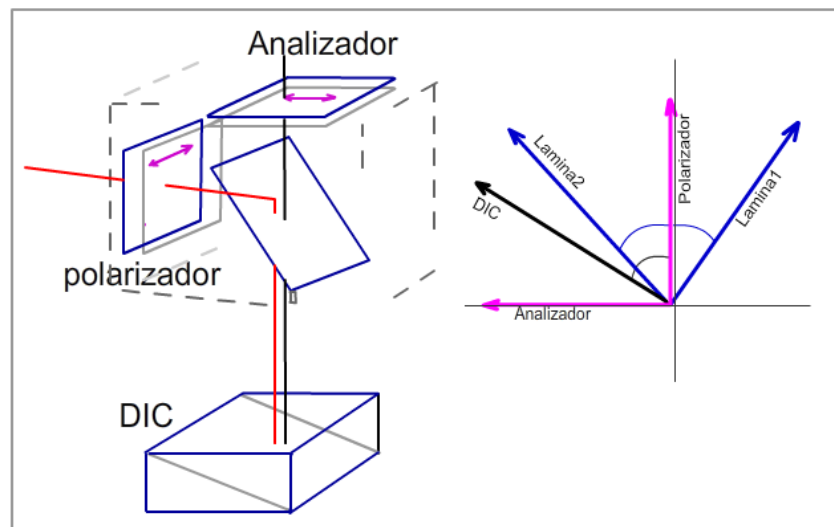
$$M_A = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \quad (2.16)$$

La matriz de la lámina  $\lambda/4$  con eje rápido horizontal.

$$M_{\frac{\lambda}{4}} = \begin{bmatrix} e^{-i\frac{\pi}{4}} & 0 \\ 0 & e^{-i\frac{\pi}{4}} \end{bmatrix} \quad (2.17)$$

La matriz del prisma Wollaston es analizada como un retardador de fase siguiendo la orientación del eje óptico.

$$M_{PW} = \begin{bmatrix} \cos \frac{\phi}{2} + i \sin \frac{\phi}{2} \cos 2\theta & i \sin \frac{\phi}{2} \cos 2\theta \\ \sin \frac{\phi}{2} \cos 2\theta & \cos \frac{\phi}{2} + i \sin \frac{\phi}{2} \cos 2\theta \end{bmatrix} \quad (2.18)$$



**Figura 16:** esquema del sistema de polarización, el analizador y el polarizador están dispuestos de forma perpendicular, al igual que láminas de fase 1 y 2.

*Fuente: autor.*

No son considerados los cambios de fase en la reflexión inherentes a la muestra debido a que en este trabajo se utiliza una muestra con un recubrimiento homogéneo, por tal motivo se presenta igual corrimiento de fase por reflexión en

ambas componentes, por otra parte se asume incidencia normal en la iluminación de la muestra. La intensidad lumínica de un punto del objeto a la salida del sistema óptico estará dada por:

$$I_{S_{C-DIC}} \propto I_E \sin^2\left(\frac{\phi}{2}\right) \quad (2.19)$$

Mientras la adquirida con la técnica de microscopia DIC es [7].

$$I_{S_{DIC}} \propto I_E \sin^2(2\alpha_{DIC}) \sin^2\left(\frac{\phi}{2}\right) \quad (2.20)$$

La ecuación (Ec 2.19) muestra que la intensidad a la salida en un sistema C-DIC únicamente depende de la fase  $\phi$  (*shift*) introducida por el prisma, la cual puede ser modificada como se mencionó anteriormente, desplazando el prisma de forma perpendicular al eje óptico del sistema. La ecuación (Ec 2.20) muestra que por el contrario en el caso de microscopia DIC la intensidad no solo tiene dependencia con la fase introducida por el prisma si no también con la orientación acimutal del mismo  $\alpha_{DIC}$ , haciendo que al ser rotado el prisma la intensidad se vea modulada por una función sinusoidal, debido a esto algunos algoritmos desarrollados para establecer la fase a partir de sus gradientes encuentran una dificultad, ya que al cambiar la orientación acimutal cambia la intensidad haciendo que la técnica sea válida para determinar gradientes en una sola dirección de desplazamiento lateral bajo los mismos parámetros de iluminación. La microscopia C-DIC garantiza independencia de la intensidad con la rotación acimutal del prisma de tal forma

que no se producen pérdidas en el contraste de la imagen facilitando controlar la orientación del corrimiento lateral (*shear*) y por lo tanto permitiendo aplicar algoritmos de recuperación de fase en diferente orientación haciendo posible adquirir mayor información del objeto de estudio.

## 2.4. MODELO INTERFEROMÉTRICO

Las dos componentes ordinaria y extraordinaria reflejadas por la muestra son recombinadas al pasar nuevamente por el prisma Wollaston generando el fenómeno de interferencia entre componentes de la misma frecuencia, la intensidad de la imagen será modulada por la fase introducida entre las ondas tanto por el prisma  $\phi$  como por la interacción con la muestra  $\theta$ . Según el modelo interferométrico [4,8], la distribución de intensidad en el plano imagen estará dado por el módulo al cuadrado de la suma de las amplitudes complejas de las dos componentes que interfieren.

$$E^o(x, y) = a_1(x, y)e^{-i[\theta_1(x, y+\Delta y)+\phi]} \quad (2.21)$$

$$E^e(x, y) = a_2(x, y)e^{-i[\theta_2(x, y)-\phi]}$$

$$E(x, y) = a_1(x, y)e^{-i[\theta_1(x, y+\Delta y)+\phi]} + a_2(x, y)e^{-i[\theta_2(x, y)-\phi]} \quad (2.22)$$

$$I = E.E^* \quad (2.23)$$

El cual es una combinación de amplitud y fase del objeto [13].

$$I(x, y) = a_1 + a_2 + 2a_1a_2 \cos(\theta_2 - \theta_1 - 2\phi) \quad (2.24)$$

En esta ecuación  $\theta_2$  y  $\theta_1$  son las fases introducidas por el objeto en cada componente las cuales están separadas por un corrimiento lateral (*shear*)  $\Delta y$  muy pequeño, del orden de la longitud de onda, en una dirección que es posible cambiar entre un ángulo de 0 a 90° llamado ángulo acimutal y que aquí se tomará como paralela al eje Y; entonces la intensidad estará modulada por los gradientes de fase en la dirección del eje Y.

$$I(x, y) = a_1 + a_2 + 2a_1a_2 \cos \left[ \Delta y \frac{\Delta\theta(x, y)}{\Delta y} - 2\phi \right] \quad (2.25)$$

$$\frac{\Delta\theta}{\Delta y} \approx \frac{d\theta}{dy} \quad \text{gradiente de fase} \quad (2.26)$$

La aproximación 2.26 será válida siempre y cuando las variaciones de fase introducidas por el objeto sean pequeñas, entonces el argumento de la función coseno (Ec 1.30) puede ser expresada como:

$$\Delta y \frac{d\theta(x, y)}{dy} - 2\phi = \frac{\lambda}{2\pi} \left( dy \frac{dR_{obj}}{dy} - 2R_p \right) \quad (2.27)$$

Donde  $R_{obj}$  y  $R_p$  son los retardos introducidos por el objeto y por el prisma respectivamente; de esta forma la imagen obtenida lleva información de los gradientes de fase generados entre dos ondas desplazadas lateralmente una distancia constante  $dy$ . Si la fuente luminosa empleada es luz blanca las diferentes componentes frecuenciales que interfieren hacen que el objeto iluminado aparezca

en color según la escala de colores de Newton [7]. Para cada frecuencia al separar la información de fase y la de amplitud del interferograma se obtiene un mapa de gradientes de fase asociados a la superficie de la muestra; sin embargo esta consideración es válida si el material de la muestra es homogéneo en su composición ya que los principales errores en este modelo son debidos a saltos de fase producidos por cambios en el índice de refracción del material [23,24], por ejemplo materiales como Au o Ag tienen un cambio de fase en la reflexión de  $140.0^\circ$  y  $142,5^\circ$  respectivamente, otros como el Fe  $157.5$ , el Al  $160.0^\circ$ , el C  $165.0^\circ$  y el Si  $177.0^\circ$ . Otro factor importante es el ruido en la imagen introducido por la cámara y las distorsiones debidas a limitaciones en la resolución del sistema formador de la imagen.

### 3. SIMULACIÓN

---

Con el fin de entender mejor el proceso de formación de la imagen C-DIC y establecer relaciones entre un modelo teórico y lo observado en la toma de datos se emplea la función de transferencia óptica coherente efectiva  $C_{Ef}(m,n)$  de este sistema, dada por el producto de la función de transferencia del sistema DIC convencional [10,11] y la función pupila del sistema óptico llamada  $c(m,n)$ :

$$C_{Ef}(m,n) = -j \sin(2\pi.n.dy - \phi)c(m,n) \quad (3.1)$$

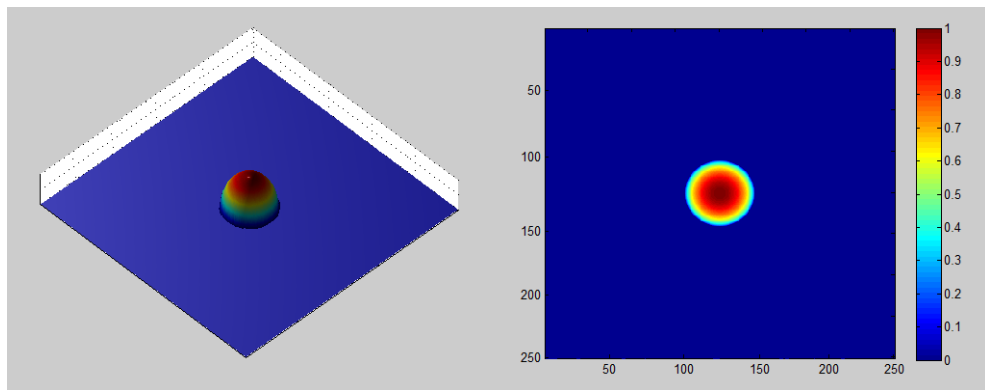
$c(m,n)$  es tomado como una apertura circular de radio igual a la frecuencia de corte  $f_c=NA/\lambda$  para una longitud de onda promedio  $\lambda$  igual a  $0.5 \times 10^{-6} \mu\text{m}$ ; NA es la apertura numérica correspondiente a un objetivo de 100x (tabla 1) ; siendo uno el valor de la función dentro de la apertura circular y cero fuera de ella. De este modo la intensidad de la imagen coherente estará dada por [8]:

$$I(x, y) = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} T_{obj}(m, n) C_{Ef}(m, n) e^{2j[mx+ny]} dm. dn \right|^2 \quad (3.2)$$

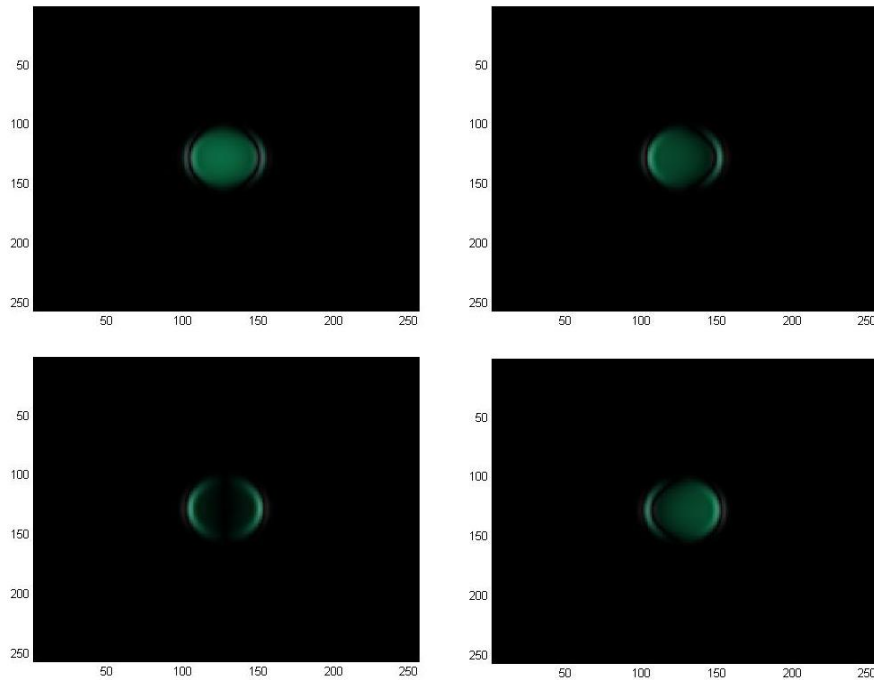
En la expresión (3.2) m y n corresponden a las frecuencias espaciales y  $T_{obj}$  a la transformada de Fourier de la función de transferencia del objeto.

### 3.1. SIMULACIÓN ESFERA

Para entender el proceso teórico mostrado anteriormente y los resultados observados en el proceso de calibración al utilizar una muestra con geometría conocida, se realizó la simulación en Matlab de una esfera de radio unidad, la esfera presenta continuidad en su geometría haciendo que las transiciones sean más suaves y no se introduzcan errores por saltos de fase abruptos que impidan el análisis del posterior proceso de calibración (figura 18).



**Figura 17:** esfera utilizada para simulación. *Fuente: autor.*



**Figura 18:** imagen Dic de una esfera de radio unidad obtenida mediante simulación en Matlab, se observa el corrimiento del patrón de interferencia mientras se realizan cuatro corrimientos de fase (shift) controlados por el prisma Wollaston. *Fuente: autor.*

Empleando el modelo de imagen coherente Dic [8,10] se aplicó (Ec 2.1) sobre el objeto circular (figura 17) obteniendo una secuencia del corrimiento de fase al cambiar el valor de  $\phi$ ; en la figura 18 son mostrados cuatro corrimientos de fase simulados asociados al prisma. En las imágenes se observa el desplazamiento de la franja de interferencia al cambiar los valores de fase  $\phi$  y este fenómeno es similar al visto en el proceso de calibración realizado con micro esferas de TiN que se muestra en el capítulo 3 de este trabajo, se utiliza en esta simulación una longitud de onda  $0.5\mu\text{m}$  que representan los canales de color en la imagen RGB obtenida con cámara del microscopio y una imagen de  $1024 \times 1024$  píxeles y una esfera de radio de  $1\mu\text{m}$ . Las franjas que barren la superficie de la esfera muestran

la correlación existente entre los gradientes de fase para diferentes puntos de la esfera, sin embargo es de esperar que para objetos que no presenten simetría definida o regular estas franjas no son observables.

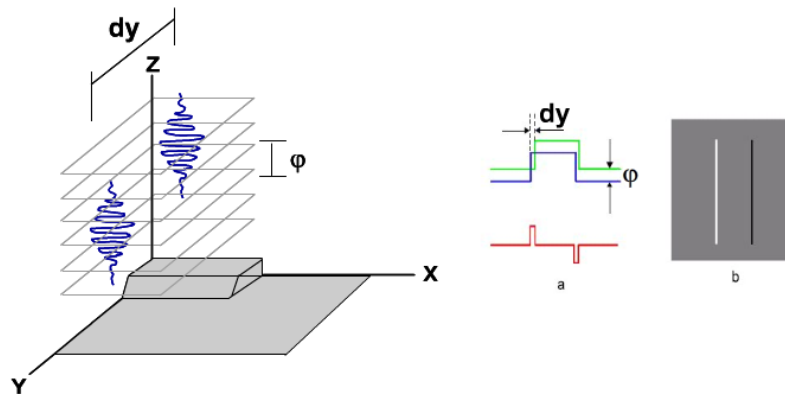
### **3.2. MATERIALES, MUESTRAS Y RECONSTRUCCIÓN**

El estudio de materiales mediante la técnica de microscopía de reflexión implica en la mayoría de los casos la preparación de muestras en forma de superficies pulidas ya sea que se trate de muestras metálicas o cristales en muestras de roca, además de esto son importantes los efectos del cambio de fase en la reflexión [22] los cuales dependen de las propiedades del material tal como composición, espesor de película, el ángulo de incidencia, longitud de onda incidente y topografía de la muestra, por este motivo, para minimizar los errores en el proceso de reconstrucción el material debe ser homogéneo en su composición, de manera que el parámetro a determinar sea la topografía de la muestra. Sin embargo Aunque para determinar la topografía la técnica requiere que el material sea homogéneo es posible trabajar con materiales no homogéneos si se aplica sobre estos un recubrimiento ya sea empleando técnicas de deposición física, química o laser, esto evita que se produzcan cambios bruscos en la fase de la onda inherentes a la reflexión pero sin que presente mayores influencias en la topografía de la muestra ya que generalmente el espesor de tales recubrimientos no supera los cien nanómetros.

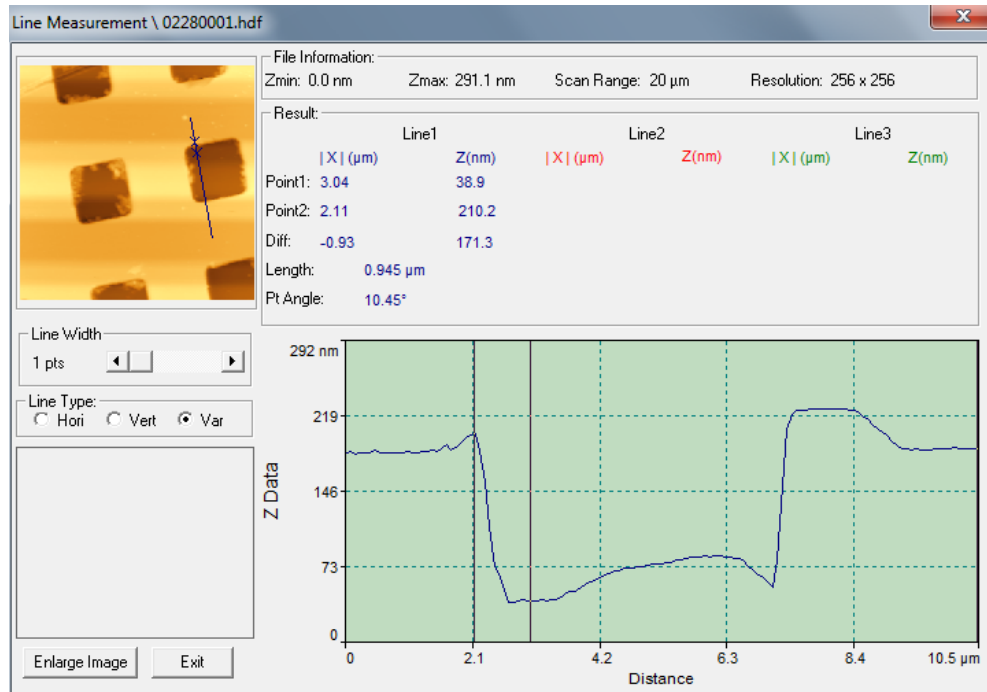
# 4. CALIBRACIÓN DEL SISTEMA

## 4.1. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES EXPERIMENTALES

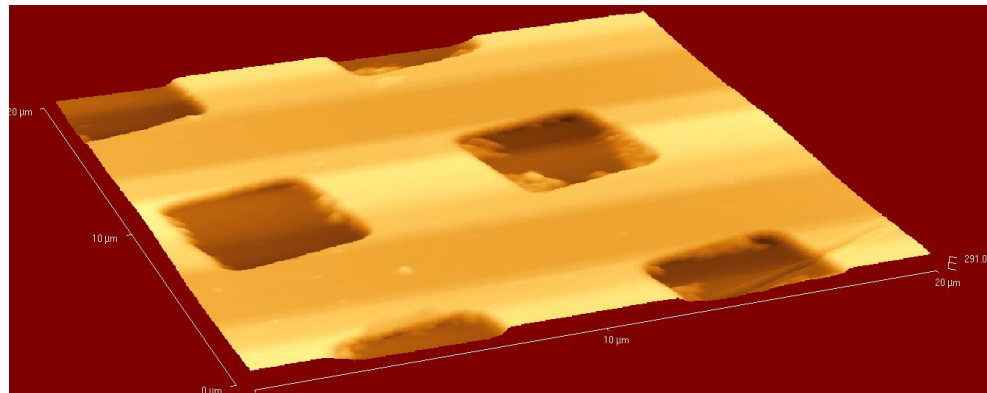
Un primer método de calibración empleado para establecer el valor del corrimiento  $dy$ , consiste en medir el desplazamiento directamente de una imagen con geometría rectangular (figura 19), para esto es necesario adquirir imágenes de una muestra que contenga un escalón con dimensiones conocidas, la muestra patrón utilizada es una superficie de silicio con huecos de forma rectangular; para conocer la topografía fue utilizado un microscopio AFM Veeco CPlI en modo contacto (figuras 20 y 21) el patrón presenta dimensiones de  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  de lado y  $200\text{nm}$  de profundidad y rugosidad promedio de  $22,6\text{ nm}$ .



**Figura 19:** imagen para establecer la calibración del corrimiento lateral directamente de la imagen. *Fuente: autor.*



**Figura 20:** muestra patrón para calibración de corrimiento lateral, imagen tomada con microscopía de fuerza atómica. *Fuente: autor.*

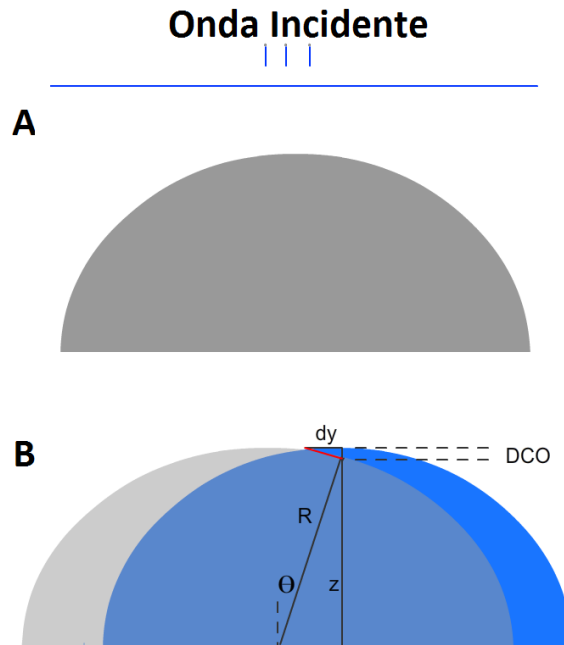


**Figura 21:** imagen AFM muestra estándar. *Fuente: autor.*

Para realizar el segundo proceso de calibración del sistema óptico con el fin de determinar el valor del corrimiento lateral  $dy$  que introduce el prisma Wollaston, se

utilizó como muestra de calibración una dispersión de esferas de Tin sobre carbón (Agar scientific) [12] con diámetros desde 5 nm hasta 30  $\mu\text{m}$ . Debido a que era desconocido el diámetro de las esferas fue necesario escogerlas, identificarlas y determinar previamente su diámetro, pero a diferencia del patrón regular anterior no es posible medir esta dispersión con la misma técnica AFM ya que poseen alturas variables haciendo que estas puedan ser arrastradas por la punta del equipo, por lo tanto aprovechando su forma fueron medidas con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido; se emplearon un total de nueve esferas y se adquirieron posteriormente imágenes de las mismas con microscopía C\_DIC.

Como se mostró en el primer capítulo, el corrimiento lateral  $\Delta y$  depende de los parámetros del prisma y del objetivo empleado, por lo tanto permanece constante a pesar de que se cambie la muestra, a partir de este hecho y aprovechando la geometría de la muestra es posible establecer una relación que determine el valor de esta constante. Siendo ya conocido el valor de los radios de las esferas y aplicando el principio asociado al gradiente de fase (figura 22) se deducen las ecuaciones 3.1 y 3.2 que servirán como herramienta de calibración del sistema óptico. El corrimiento de fase es calibrado a partir del patrón de interferencia sobre cada esfera, posteriormente esta calibración es utilizada para determinar el desfase introducido por las diferencias de camino óptico originadas por los cambios en el radio de las esferas.



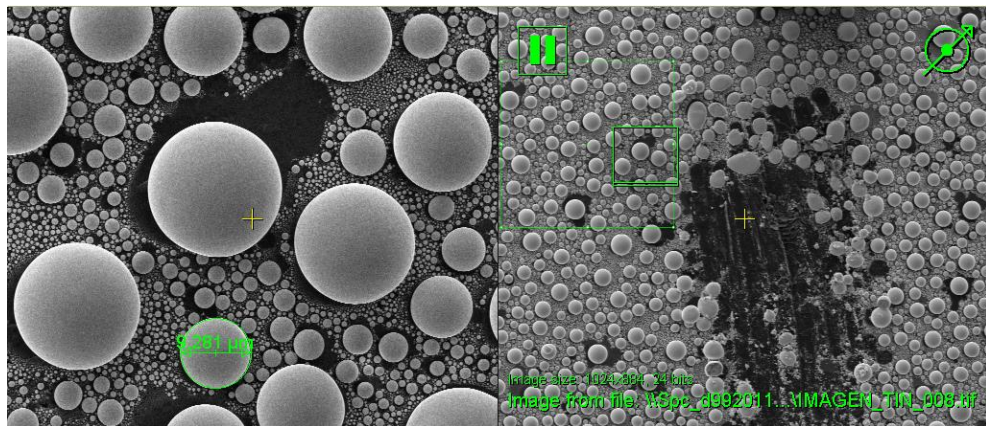
**Figura 22: A)** representación de la esfera **B)** corrimiento lateral  $dy$  en la esfera de calibración, son conocidos el radio de la esfera y la diferencia de camino óptico en función del desplazamiento de las franjas de interferencia mencionadas en el proceso de calibración. *Fuente: autor.*

$$\tan \theta = \frac{DCO}{dy} \quad \text{y} \quad \text{sen} \theta = \frac{dy}{R} \quad (4.1)$$

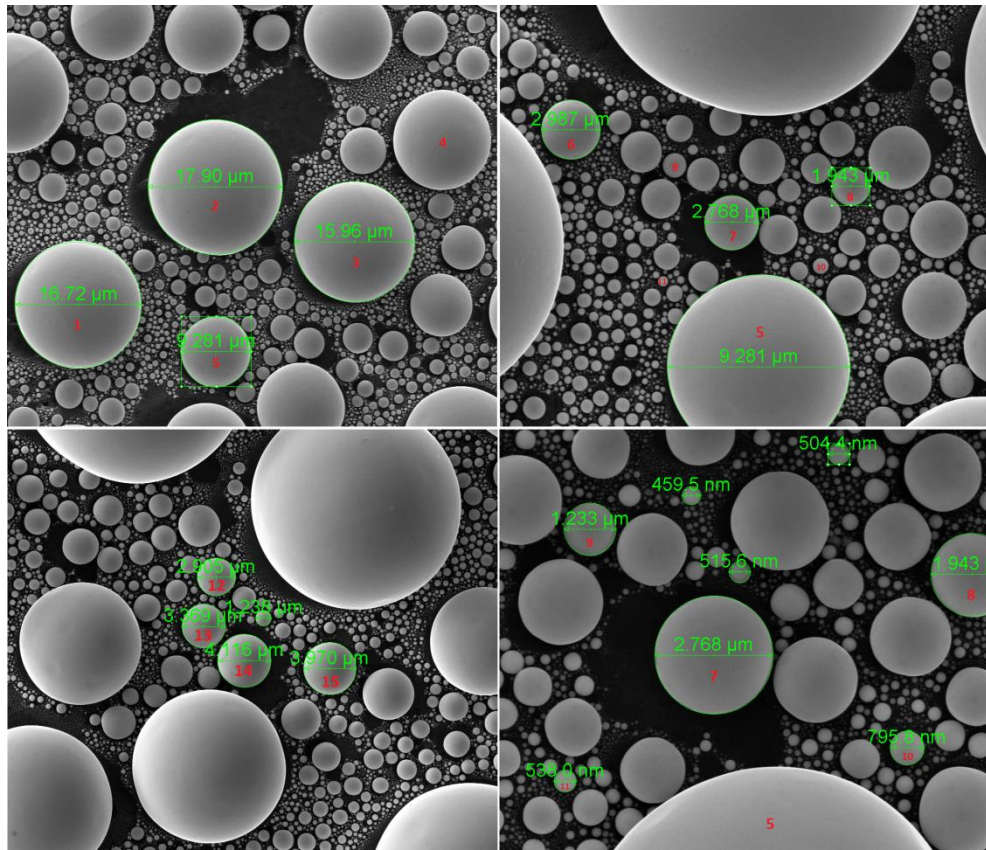
$$\text{siendo} \quad \varphi = \frac{2\pi}{\lambda} DCO \quad \varphi = \frac{2\pi dy^2}{\lambda R} \quad (4.2)$$

Imágenes de una dispersión de esferas de Estaño Tin fueron adquiridas mediante el microscopio electrónico de barrido Quanta FEG 650 cuya resolución es de 10 nm, utilizado un detector ETD (Detector Everhardt Thornley) en modo Electrones Secundarios; a partir de este paso se procedió a medir el diámetro de nueve

esferas de dicha dispersión con valores de radio desde  $17.90\mu\text{m}$  hasta  $1.94\mu\text{m}$  (figuras 23, 24,) ya que en este intervalo de valores de radio se comprobó mediante microscopia C-DIC que era posible observar franjas de interferencia; fue necesario establecer una marca de referencia en el patrón de calibración debido a que no es posible medirlas simultáneamente con el mismo nivel de magnificación, esta marca además sirve como parámetro de identificación al utilizar el microscopio Carl Zeiss empleando la técnica C-DIC.



**Figura 23:** muestra calibración dispersión de esferas de Tin. *Fuente: autor.*

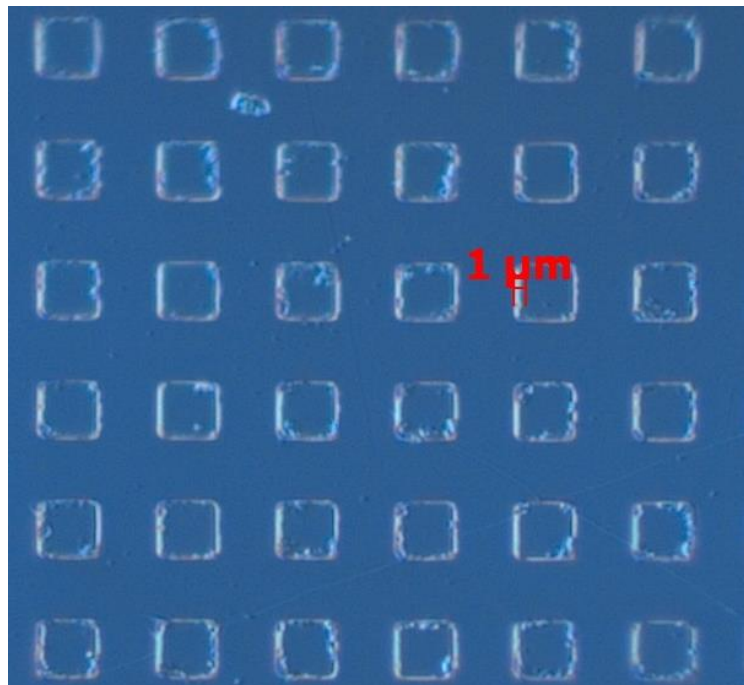


**Figura 24:** imágenes SEM de la muestra utilizada para realizar la calibración, cada esfera está marcada con un número para su identificación y lleva el valor del diámetro medido con el software del equipo. *Fuente: autor.*

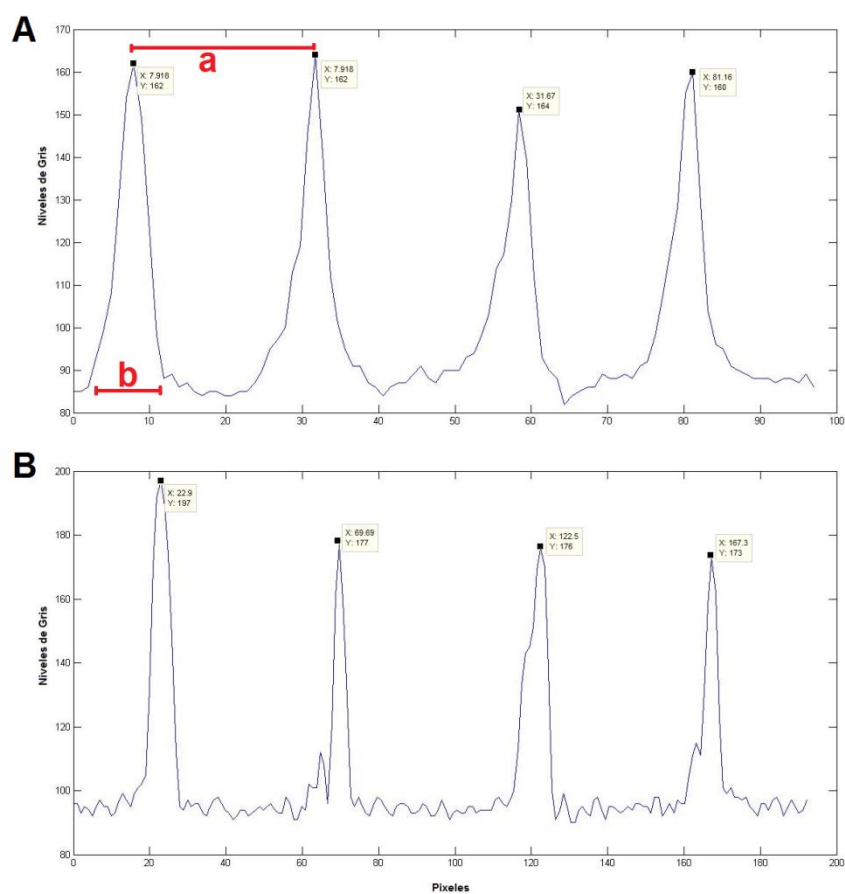
## 4.2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES C-DIC

Las imágenes adquiridas con el microscopio Axiolmager corresponden a secciones ópticas de la muestra, cada imagen contiene información de alto contraste del plano que está en foco y contribuciones de la muestra con bajo contraste correspondiente a los planos subyacentes o fuera de foco.

Una de las formas de calibrar el desplazamiento  $dz$  como se mencionó anteriormente es a través del patrón regular (figura 25). Una vez adquiridas las imágenes en microscopía C\_DIC se grafican sus perfiles y se determinan los parámetros de calibración **a** y **b** (figura 26) consistentes en medir de la distancia entre picos estableciendo la relación pixel-micrómetro y el ancho de la base del pico asociado a cada corrimiento lateral tanto para imágenes con objetivo de 50x como 100x (tabla 2 y 3).



**Figura 25:** imagen C-DIC con objetivo 100x del patrón de calibración utilizado para medir el corrimiento lateral, en este se busca que la orientación del corrimiento sea paralelo a las caras superior e inferior de los huecos rectangulares. *Fuente: autor.*



**Figura 26:** imagen perfil muestra de calibración rectángulos a partir de una imagen C-DIC tomadas con A) objetivo de 50x y B) objetivo de 100x. *Fuente: Autor.*

**Tabla 2:** valores para calibración corrimiento lateral con objetivo de 50x. *Fuente: autor.*

	Pico1 (píxeles)	Pico2 (píxeles)	Pico3 (píxeles)	Pico4 (píxeles)
Valor (a)	8	32	59	80
Valor (b)	10	10	9	9

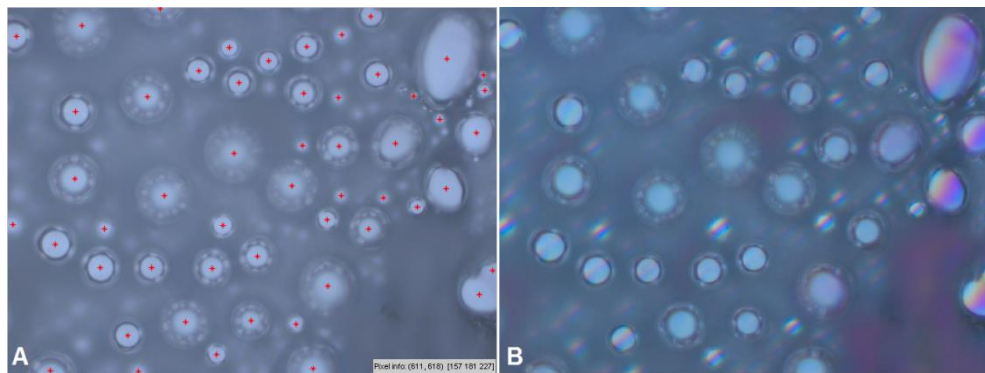
**Tabla 3:** valores para calibración corrimiento lateral con objetivo de 100x. *Fuente: autor.*

	Pico1 (píxeles)	Pico2 (píxeles)	Pico3 (píxeles)	Pico4 (píxeles)
Valor (a)	23	70	123	167
Valor (b)	10	6	11	8

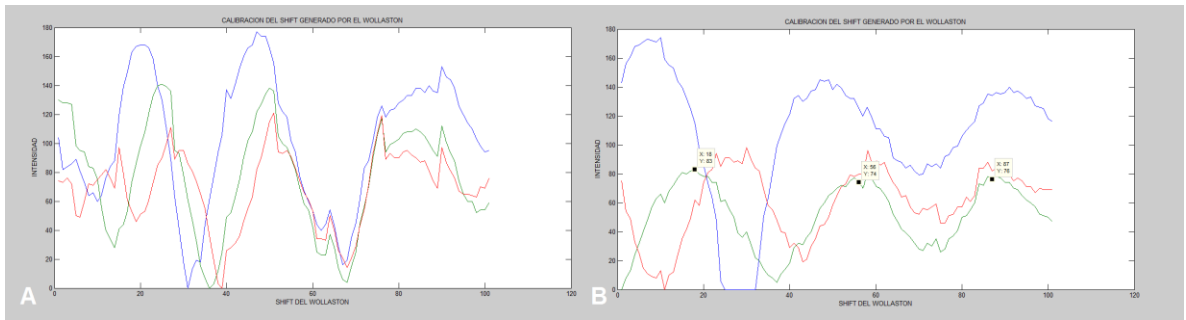
De los valores observados en la tabla 2 y 3 la relación micrómetro/ píxel es de  $0.20\mu\text{m}$  y  $0.10\mu\text{m}$  para las imágenes obtenidas con objetivos de 50x y 100x respectivamente, el valor calculado para el desplazamiento lateral [14] (*Shear*) mediante los valores b (tablas 2 y 3) y su desviación estándar es de  $1.9\pm 0.1\mu\text{m}$  para un objetivo de 50x y  $0.8\pm 0.2\mu\text{m}$  para un objetivo de 100x (figuras 26A- 26B).

El segundo método consistió en adquirir imágenes de nueve esferas de diámetro conocido, se modificó el valor de fase  $\phi$  de 0 a  $3\pi$  con paso de  $3\pi/100$  y con error de  $3\pi/500$  por paso mediante el desplazamiento del prisma Wollaston, un total de 1313 imágenes con resolución de  $1388 \times 1040$  píxeles fueron tomadas con objetivos de 50x y 100x en modo C-DIC (figura 27 y 29). Se realizó el análisis de las imágenes en Matlab determinando la evolución del interferograma en el centro de cada esfera (figura 27) para establecer el centro geométrico de cada esfera se realiza el procesamiento de la imagen umbralizando la imagen adquirida en el modo de campo claro; los valores obtenidos se graficaron para verificar el corrimiento del patrón de franjas (figuras 28 y 29) y determinar el cambio de fase, los resultados son mostrados en las tablas 4 y 5. Como se señaló en el primer capítulo se aprovecha la relación lineal que existe entre la fase introducida por el prisma (*shift*) y el desplazamiento lateral del mismo [5], el corrimiento de fase que genera el prisma en cada paso es determinado midiendo la distancia promedio

entre picos consecutivos para diferentes esferas y midiendo a su vez la cantidad de desplazamientos realizados con el prisma (figura 30 y 31), observando que el corrimiento por paso del prisma tiene un valor promedio de  $\pi/33.3$  [rad/paso] para el objetivo de 50x y  $\pi/40$  [rad/paso] para un objetivo de 100x, por otro lado para definir el corrimiento de fase generado por el tamaño de la esfera, se observó que para cada esfera el patrón de interferencia esta desplazado respecto al centro de la misma y por lo tanto existe una relación directa entre este desplazamiento y el radio de cada esfera, este desplazamiento se utilizó para definir el valor de  $dy$  con ayuda de la ecuación (Ec 3.2) (tablas 4 y 5).

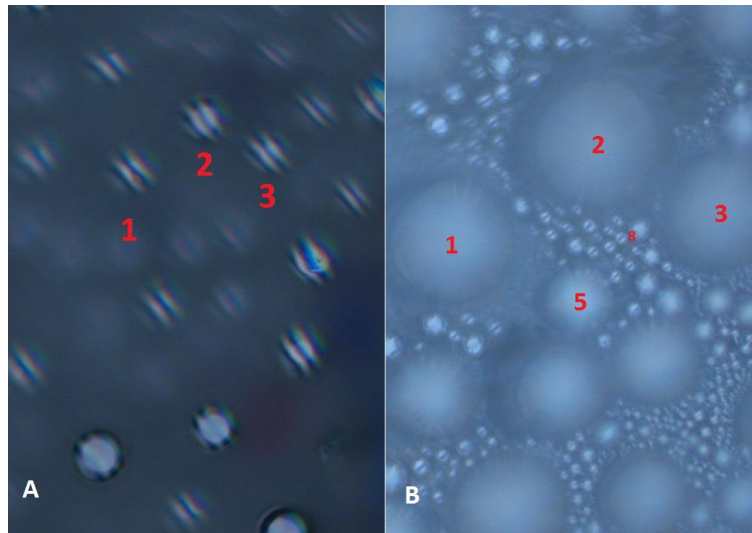


**Figura 27: A)** centro de esferas ubicado mediante el procesamiento de la imagen de campo claro en Matlab **B)** Interferograma para calibración del *shift* y *shear* introducidos por el prisma Wollaston para un objetivo de 100x. *Fuente: autor.*

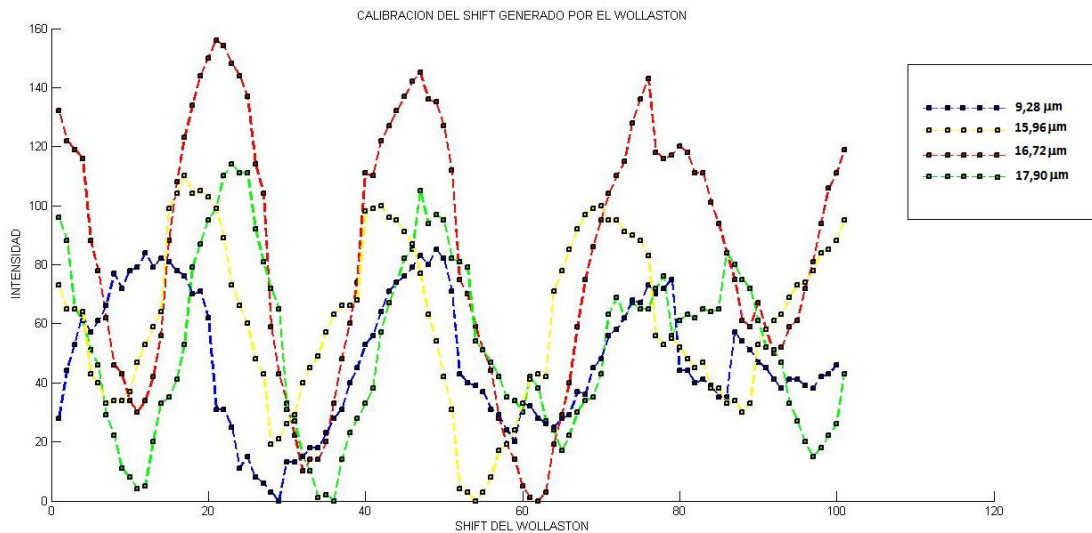


**Figura 28:** evolución del interferograma medido en el centro de la esfera de diámetro  $17,90\mu\text{m}$ . **A)** para el objetivo de 50x. **B)** objetivo de 100x en función de desplazamiento del prisma para los planos RGB. *Fuente: autor.*

El perfil del interferograma en algunas imágenes pierde intensidad después de un tiempo (figura 26) debido a pequeños cambios en el foco de la imagen posiblemente generados por cambios en la temperatura de la muestra que ocurren cuando se mantiene expuesta a la fuente de luz del microscopio por un largo periodo de tiempo, esto presenta gran importancia debido a que se requiere que la muestra esté en foco mientras se toman las 101 imágenes que corresponden al desplazamiento total del prisma.

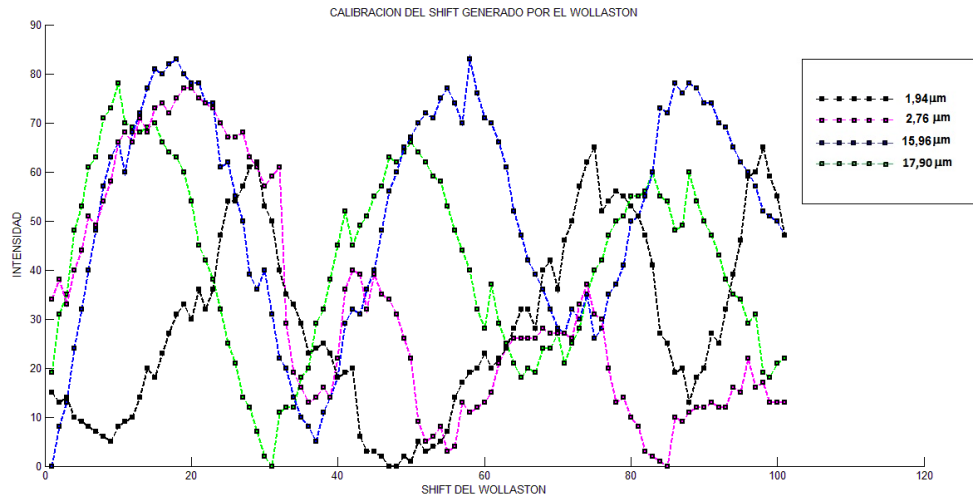


**Figura 29:** Interferograma de calibración del *shift* en el prisma Wollaston objetivo 50x, **A)** calibración con esfera 1, **B)** calibración con esfera 8. *Fuente: autor.*



**Figura 30:** evolución del interferograma medido en el centro de cuatro esferas en función de desplazamiento del prisma para los planos RGB, se ha graficado únicamente el plano verde de cada interferograma utilizando el objetivo de 50x.

*Fuente: autor.*



**Figura 31:** evolución del interferograma medido en el centro de cuatro esferas en función de desplazamiento del prisma para los planos RGB, se ha graficado únicamente el plano verde de cada interferograma utilizando el objetivo de 100x.

*Fuente: autor.*

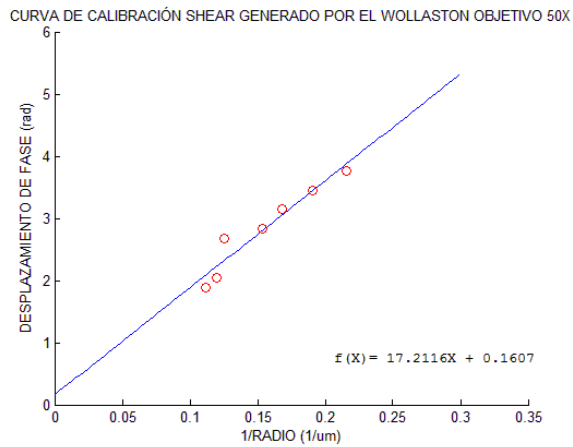
**Tabla 4:** valores del corrimiento del pico de máximo de intensidad medidas respecto al centro de cada esfera, para siete esferas observadas con objetivo de

50x. *Fuente: autor.*

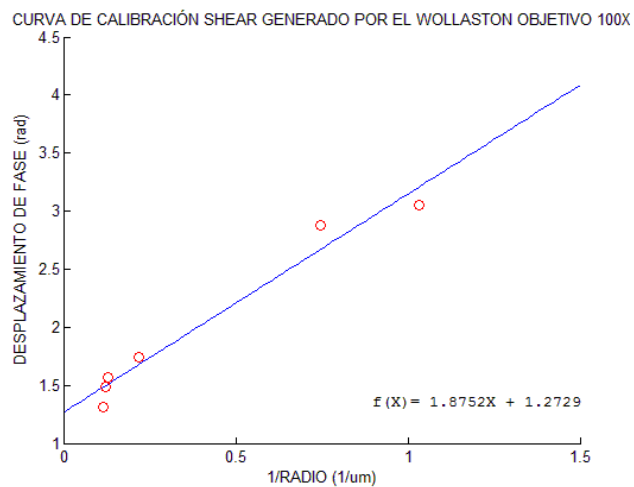
Diámetro Esfera ( $\mu\text{m}$ )	17.90	16.72	15.96	12.99	11.92	10.49	9.28
$\Delta\phi$ Objetivo 50x	24	22	20	18	17	13	12

**Tabla 5:** valores del corrimiento del pico de máximo de intensidad medidas respecto al centro de cada esfera, para seis esferas observadas con objetivo de 100x. *Fuente: autor.*

Diámetro Esfera ( $\mu\text{m}$ )	17.90	16.72	15.96	9.28	2.768	1.94
$\Delta\phi$ Objetivo100x	15	17	18	20	33	35



**Figura 32:** curva de calibración del corrimiento lateral (*shear*) para el objetivo de 50x. *Fuente: autor.*



**Figura 33:** curva de calibración del corrimiento lateral (*shear*) para el objetivo de 100x. *Fuente: autor.*

El valor obtenido de la ecuación (Ec 3.2) (Figuras 32 y 33) para el desplazamiento lateral [14] (*Shear*) medido sobre las esferas con el objetivo de 50x es de  $1.48\mu\text{m}$  y con el objetivo de 100x es de  $0.38\mu\text{m}$ .

# 5. RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL

---

## 5.1. INFORMACIÓN CODIFICADA EN FASE

### 5.1.1. PHASE SHIFTING

Como se mostró en los capítulos anteriores la información obtenida en la imagen C-DIC consiste de información de amplitud e información de gradientes de fase. Si se quiere recuperar la fase a partir de estos gradientes es necesario separar esta información contenida en la imagen; los algoritmos de *phase shifting* son empleados para recuperar la fase a partir del interferograma, debido a que el dominio de la función utilizada para su recuperación está comprendida entre  $-\pi/2$  y  $\pi/2$  se requiere un proceso posterior de desenvolvimiento (*Umwraping*) para conseguir una fase continua. En el caso de las imágenes C-DIC no se recupera la fase sino sus gradientes, por tal motivo es necesario interpretar el gradiente y recuperar su información ya sea utilizando herramientas como la integración directamente sobre la imagen o trabajando en el dominio frecuencial con filtros que permitan invertir este proceso pero esa vez sin la necesidad de realizar el proceso de *umwrapping*.

El método de *phase shifting*, se basa en determinar la fase a partir de un interferograma adquiriendo varias imágenes con diferencias de fase en una cantidad conocida que puede ser introducida por el objeto de análisis o por el sistema óptico entre los haces de referencia [13].

Considerando la interferencia de dos ondas como:

$$I(r) = a(r) + b(r) \cos[\phi_0(r) + k_0 \cdot r + \Delta] \quad (5.1)$$

Donde el primer término  $a(r)$  corresponde al fondo continuo, el segundo a la modulación de fase y  $\phi$  la fase de interés. Separando el argumento del coseno mediante el uso de identidades trigonométricas.

$$I(r) = a(r) + b(r) [\cos \phi_0(r) \cos(\Delta) - \sin \phi_0(r) \sin(\Delta)] \quad (5.2)$$

De esta ecuación observamos que existen tres términos desconocidos:  $a$ ,  $b \cos \phi$  y  $b \sin \phi$ , siguiendo el análisis por mínimos cuadrados, con el fin de separar los términos conocidos, como  $\Delta$ , de los no conocidos como  $\phi$ , es necesario escribir la ecuación (Ec 5.2) de la forma.

$$\begin{aligned} I(r) &= a_0(r) + a_1(r) \cos(\Delta) - a_2(r) \sin(\Delta) & (5.3) \\ a_0(r) &= a(r) \\ a_1(r) &= b(r) \cos \phi_0(r) \\ a_2(r) &= -b(r) \sin \phi_0(r) \end{aligned}$$

En el análisis por mínimos cuadrados se desea minimizar el error en la función  $E^2$ , término asociado con la varianza para cada punto del interferograma.  $E^2$  está definido como:

$$E^2(r_i) = \sum_{n=1}^N \left[ I_n(r_i) - a_0 r_i - a_1(r_i) \cos(\Delta) - a_2(r_i) \sin(\Delta) \right]^2 \quad (5.4)$$

Por diferenciación de la ecuación anterior con respecto a los tres términos desconocidos se presenta la solución de forma matricial como:

$$\begin{bmatrix} N & \sum \cos \Delta & \sum \sin \Delta \\ \sum \cos \Delta & \sum \cos^2 \Delta & \sum \cos \Delta \sin \Delta \\ \sum \sin \Delta & \sum \cos \Delta \sin \Delta & \sum \sin^2 \Delta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_0(r_i) \\ a_1(r_i) \\ a_2(r_i) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum I_n(r_i) \\ \sum I_n(r_i) \cos \Delta \\ \sum I_n(r_i) \sin \Delta \end{bmatrix} \quad (5.5)$$

También representado como:

$$A(\Delta) a(r_i) = b(r_i, \Delta) \quad (5.6)$$

Donde A depende de los términos de fase conocidos en el problema y b de los datos obtenidos del interferograma, para buscar los valores de  $a(r_i)$  se multiplica ambos lados de la ecuación (Ec 5.6) por la inversa de la matriz A.

La ecuación básica para la interferometría *phase shifting* estará dada por

$$\phi(r) = \tan^{-1} \left[ \frac{a_2(r_i)}{a_1(r_i)} \right] \quad (5.6)$$

De esta forma son necesarios un mínimo de tres interferogramas con corrimiento de fase  $\Delta$  conocidos para determinar la fase  $\phi$ , sin embargo es posible utilizar más de tres interferogramas obteniendo una mejor aproximación.

### 5.1.1.1. Algoritmo a Cuatro Imágenes

Consiste en tomar cuatro interferogramas con corrimiento de fase conocido entre ellos, para obtenerlo es necesario generar un corrimiento de fase entre las componentes ordinaria y extraordinaria de  $\pi/2$  ó corrimiento de  $\lambda/8$ .

$$\begin{aligned} I_0(r) &= a(r) + b(r) \cos[\phi_0(r)] & (5.7) \\ I_1(r) &= a(r) + b(r) \cos\left[\phi_0(r) + \frac{\pi}{2}\right] \\ I_2(r) &= a(r) + b(r) \cos[\phi_0(r) + \pi] \\ I_3(r) &= a(r) + b(r) \cos\left[\phi_0(r) + \frac{3\pi}{2}\right] \end{aligned}$$

La fase en cada punto puede ser recuperada mediante la ecuación

$$\phi(r) = \arctan \left[ \frac{I_1 - I_3}{I_0 - I_2} \right] \quad (5.8)$$

### 5.1.2. ALGORITMO DE INTEGRACIÓN DE ESPIRAL DE FASE

Un método para invertir el gradiente de fase y obtener la fase continua es conocido como algoritmo de fase en espiral, este método es utilizado porque disminuye los errores direccionales introducidos por métodos iterativos o asociados con la integración en la dirección del corrimiento lateral *shear*.

Para poder desarrollar este método es necesario combinar dos imágenes *phase shifting* con información de gradientes de fase ortogonales  $(x, y)$  y escribirlas como la función compleja [11].

$$g(x, y) = \Delta\phi_x + i\Delta\phi_y \quad (5.9)$$

Donde  $\Delta\phi$  representa la información de gradientes de fase en direcciones mutuamente perpendiculares aquí llamadas  $x, y$ .

$$\frac{\Delta\phi}{\Delta y} = \frac{\phi(y - \Delta y) - \phi(y + \Delta y)}{2\Delta y} \quad (5.10)$$

Entonces la función  $g(x, y)$  puede ser escrita como:

$$g(x, y) = \frac{1}{2} [\phi(x - \Delta x, y) - \phi(x, y + \Delta y) + i\phi(x, y - \Delta y) - i\phi(x, y + \Delta y)] \quad (5.10)$$

Aplicando el teorema de traslación de la transformada de Fourier [2].

$$TF \{g(x, y)\} = G(f_x, f_y) = \int \int_{-\infty}^{\infty} g(x, y) e^{i2\pi(f_x x - f_y y)} dx dy \quad (5.11)$$

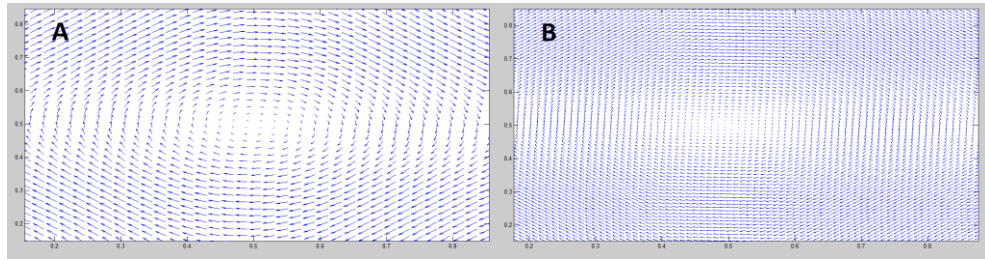
$$G(f_x, f_y) = \phi(f_x, f_y) [e^{i2\pi f_x \Delta x} - e^{-i2\pi f_x \Delta x} + i e^{j2\pi f_x \Delta y} - i e^{-i2\pi f_x \Delta y}] \quad (5.12)$$

También escrito de la forma

$$G(f_x, f_y) = \phi(f_x, f_y) 2i [\sin(2\pi f_x \Delta x) + i \sin(2\pi f_y \Delta y)] \quad (5.13)$$

De la expresión anterior se define a H (figura 31) como la función de espiral de fase:

$$H(f_x, f_y) = 2i [\sin(2\pi f_x \Delta x) + i \sin(2\pi f_y \Delta y)] \quad (5.14)$$



**Figura 34:** función espiral de fase según el número de componentes frecuenciales presentes en la imagen. **B** con el doble de componentes que **A**. *Fuente: autor.*

Utilizando las ecuaciones (Ec 5.13), (Ec 5.14) se obtiene el término de fase

$$\phi(f_x, f_y) = \frac{G(f_x, f_y)}{H(f_x, f_y)} \quad (5.15)$$

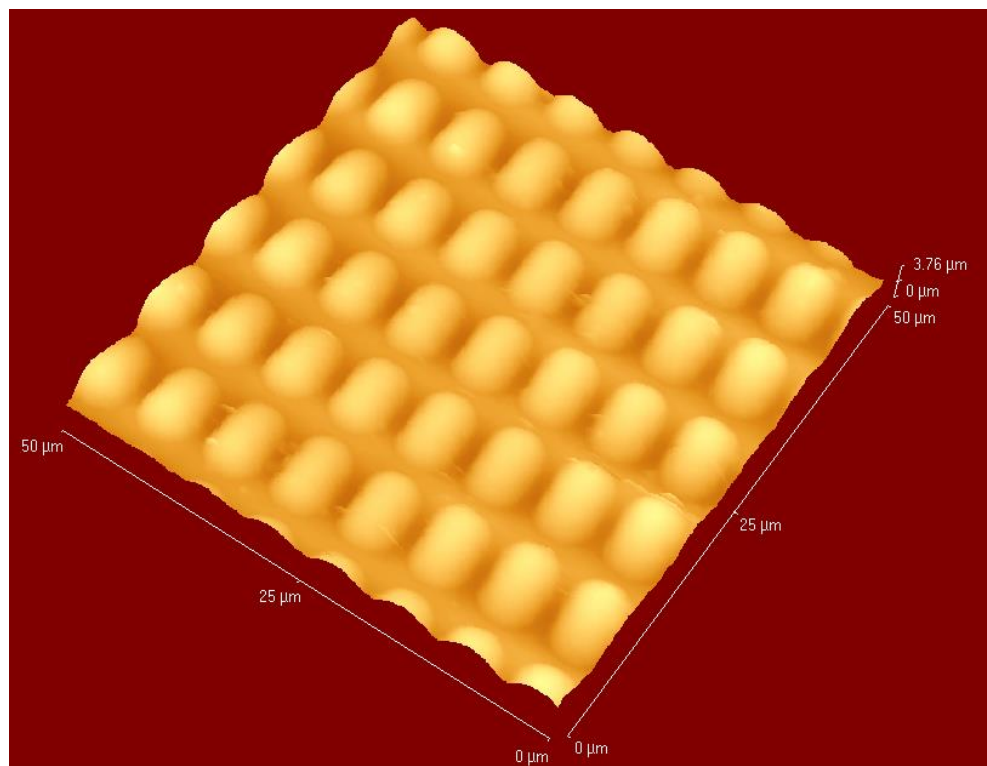
Finalmente aplicando la transformada de Fourier inversa se encuentra la fase asociada con el objeto.

$$TF\{\phi(f_x, f_y)\}^{-1} = \phi(x, y) \quad (5.16)$$

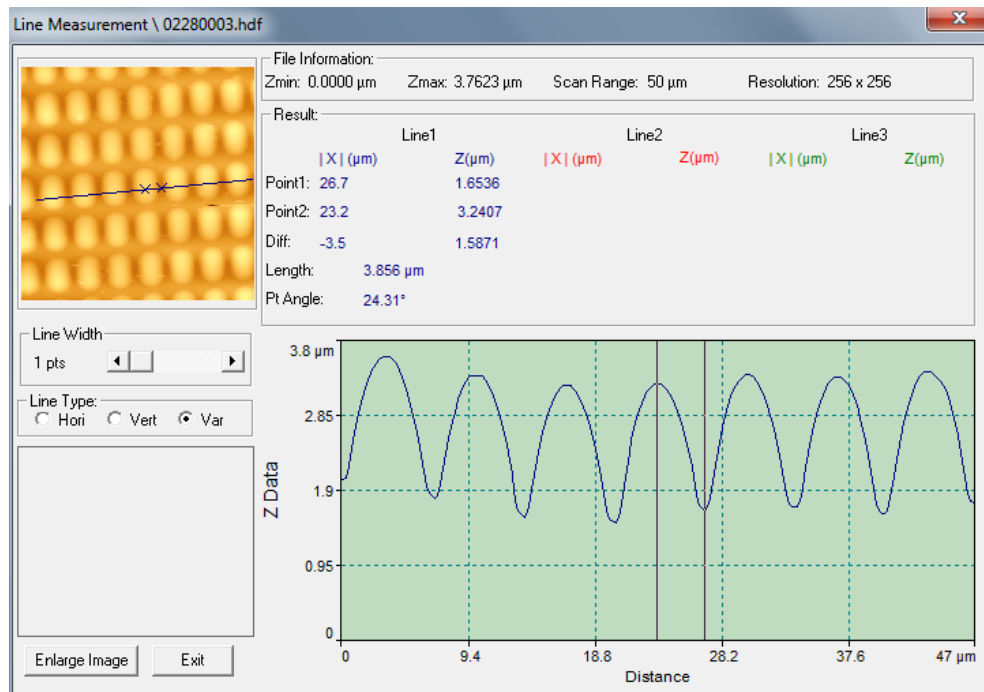
## 5.2. METODOLOGIA DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES PARA RECONSTRUCCIÓN

La muestra a reconstruir consiste en una matriz CCD (figura 35) a la cual se le retiró el cristal protector y posteriormente se recubrió mediante la técnica de pulverización catódica con un metalizador QUORUM Q150R ES con una película de oro de espesor cercano a los 100 nm, esto con el fin de conseguir homogeneidad y mejorar la reflexión del material. Se procedió a determinar la topografía de las microlentes mediante la técnica de microscopia de fuerza

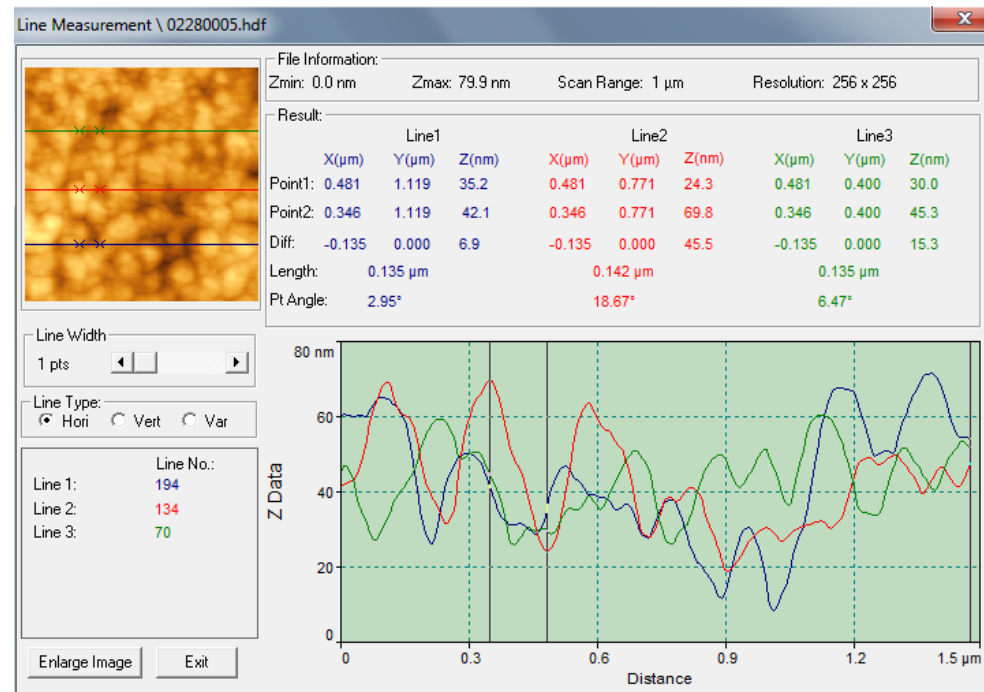
atómica, estableciendo que cada microlente tiene una altura promedio de  $1.58 \mu\text{m}$ , el diámetro del semieje menor es de  $6,5 \mu\text{m}$  y el del semieje mayor es  $8,2 \mu\text{m}$  (figura 36) y el material presenta una rugosidad promedio de  $56,6 \text{ nm}$  (figura 37). Se realizó la reconstrucción de la muestra utilizando el método de focalización empleado para adquirir la figura 1 con el fin de posteriormente comparar los resultados obtenidos, sin embargo debido a que el tamaño de las microlentes está cerca de la resolución axial del objetivo empleado no fue posible obtener topografía (figura 42).



**Figura 35:** imagen 3D AFM de matriz CCD. *Fuente: autor.*



**Figura 36:** imagen 2D y perfil de matriz CCD utilizando microscopia de fuerza atómica en modo contacto, software Veeco DI SPMLab NT ver 6.0.2. *Fuente: autor*



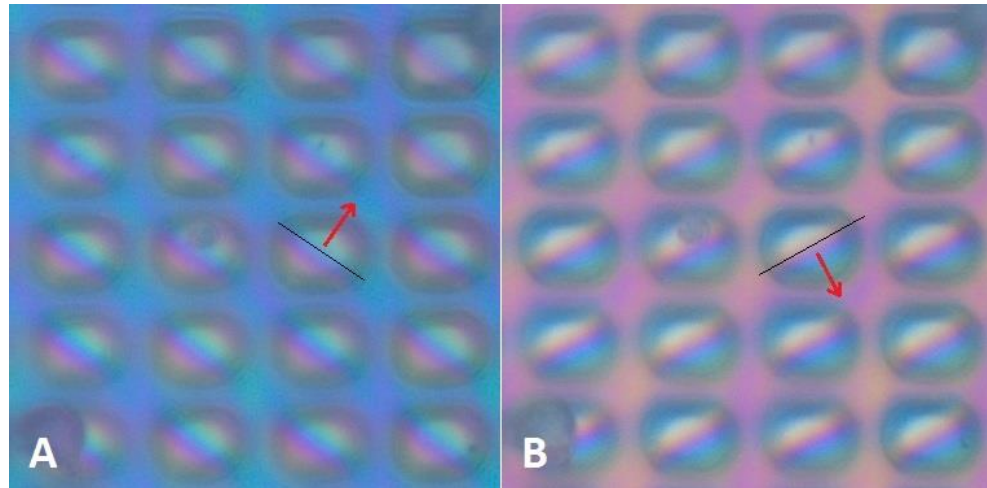
**Figura 37:** imagen rugosidad de superficie utilizando microscopia de fuerza atómica en modo contacto, software Veeco DI SPMLab NT ver 6.0.2. *Fuente: autor.*

Una vez recubierta la muestra se procede a la toma de imágenes con el microscopio Carl Zeiss mediante la técnica C-DIC, para esto el microscopio dispone de dos prisma llamados DIC1 y DIC2 y el módulo de polarización circular, debido a que la calibración fue realizada con el prisma DIC2 se inicia el proceso de toma de imágenes con esta configuración.

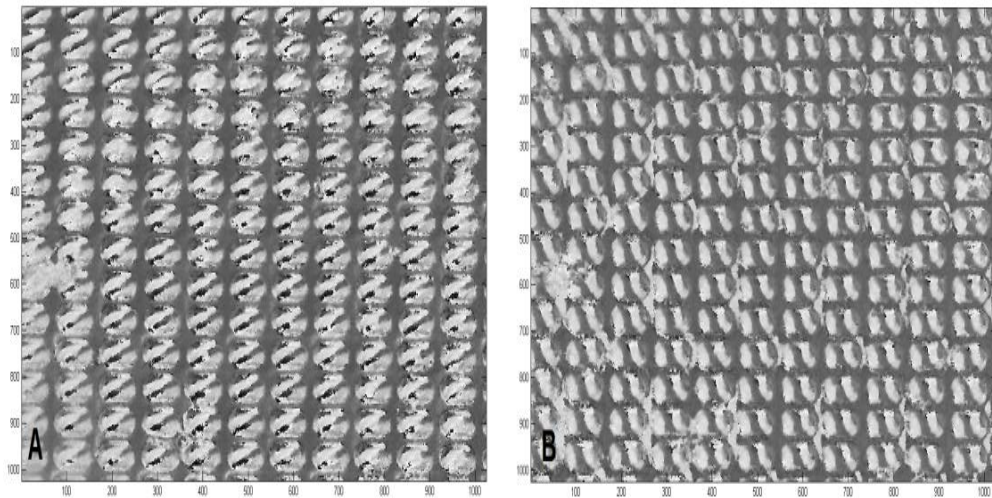
El procedimiento que se siguió para la toma de imágenes se describe a continuación:

1. Se adquieren cuatro imágenes C-DIC de la CCD con objetivo 100x, desplazamiento lateral (*shear*) con ángulo de 45 grados en dirección acimutal (figura 38A) y con corrimientos de fase (*shift*) de 0,  $\pi/2$ ,  $\pi$ ,  $3\pi/2$  estas imágenes serán utilizadas para aplicar el algoritmo de *phase shifting*.
2. Se realiza el proceso del numeral anterior para cuatro imágenes con desplazamiento lateral en dirección perpendicular (figura 38B) e iguales corrimientos de fase y se aplica nuevamente la técnica de *phase shifting*.
3. Se recortan las imágenes de 1380x1040 a 1024x1024 para evitar inconvenientes al aplicar la transformada de Fourier.
4. Se combinan las dos imágenes obtenidas por *phase shifting* para construir la función compleja (Ec5.9).
5. Se aplica la transformada de Fourier a la función obtenida en el paso anterior.
6. Se aplica el filtro función espiral de fase  $H(f_x, f_y)$  (Ec 5.14), utilizando los valores obtenidos de corrimiento lateral (*shear*) en el proceso de calibración.
7. Se aplica la transformada de Fourier inversa al resultado obtenido en el paso anterior obteniéndose una imagen de fase.

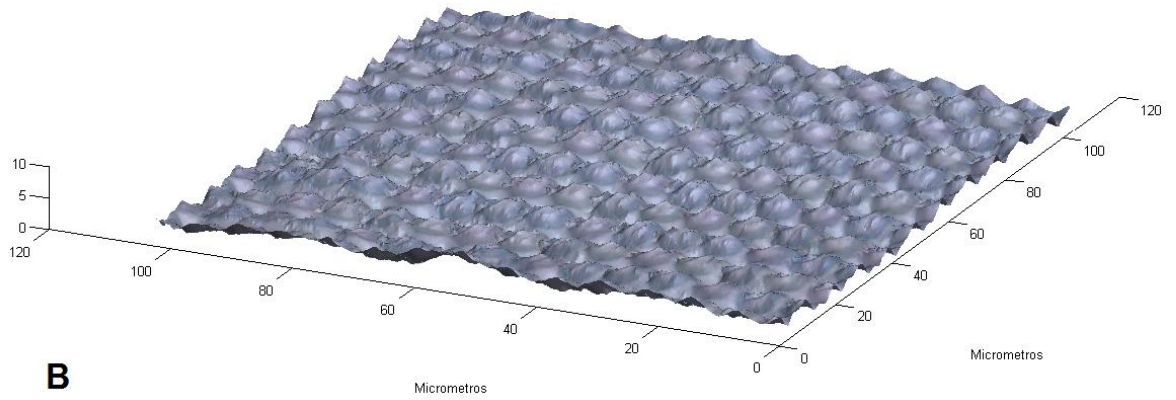
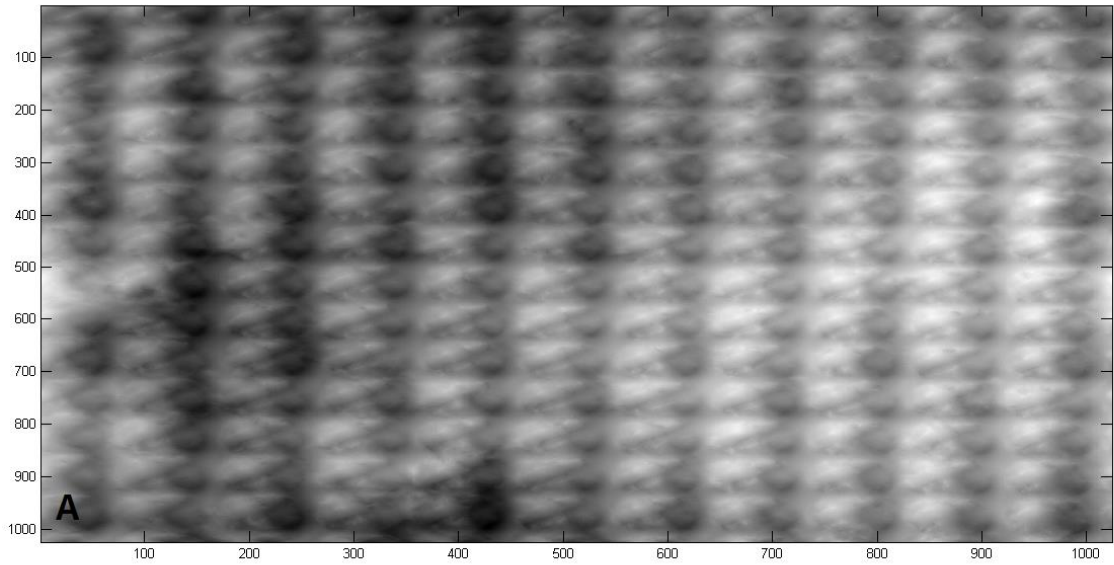
8. Se realiza el proceso de conversión de píxeles a micrómetros utilizando los datos conocidos en el proceso de calibración.
9. Finalmente se grafica el resultado 3D y el perfil de línea en dos direcciones con el software Matlab®.



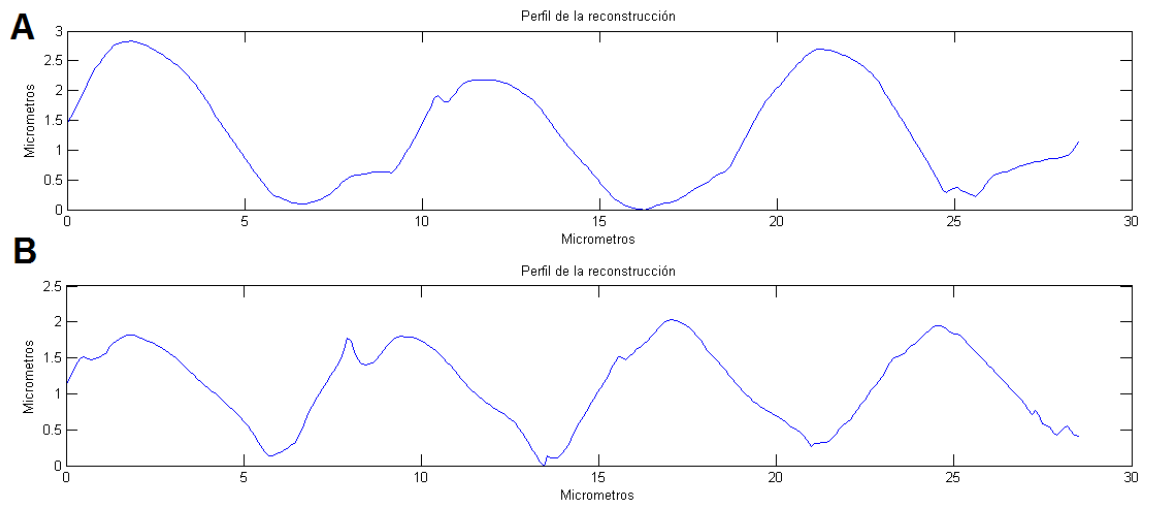
**Figura 38:** imágenes con rotación acimutal y dirección de corrimiento lateral (*shear*) mutuamente perpendicular. **A)** 45 grados, **B)** – 45 grados. *Fuente: autor.*



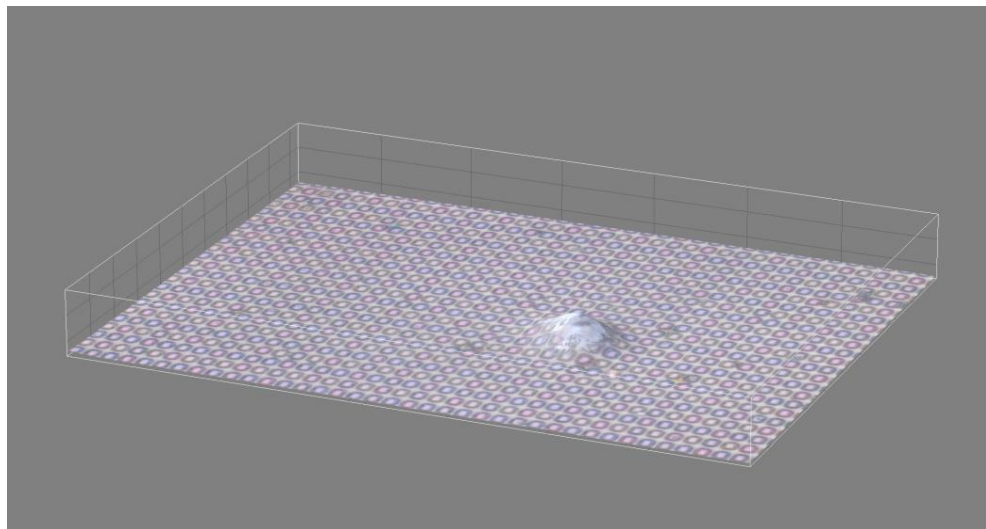
**Figura 39:** imágenes obtenidas después de aplicar *phase shifting* con algoritmo a cuatro imágenes en dos direcciones de corrimiento lateral (*shear*) mutuamente perpendicular. **A)** 45 grados, **B)** – 45 grados. *Fuente: autor.*



**Figura 40:** muestra reconstruida. **A)** fase obtenida a partir de algoritmo de integración de fase en espiral, **B)** topografía de la CCD obtenida con base en la fase y la calibración del sistema óptico, visualización 3D en Matlab. *Fuente: autor.*



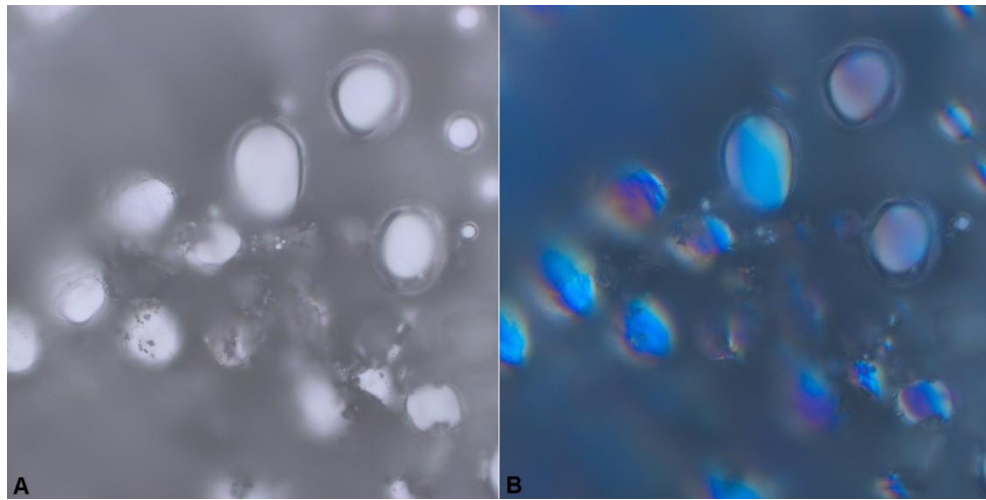
**Figura 41:** Perfiles obtenidos a partir de la reconstrucción de micro-lentes con forma de elipse en la base **A)** perfil tomado en la dirección del semieje mayor, **B)** perfil tomado en la dirección del semieje menor de las micro-lentes. *Fuente: autor.*



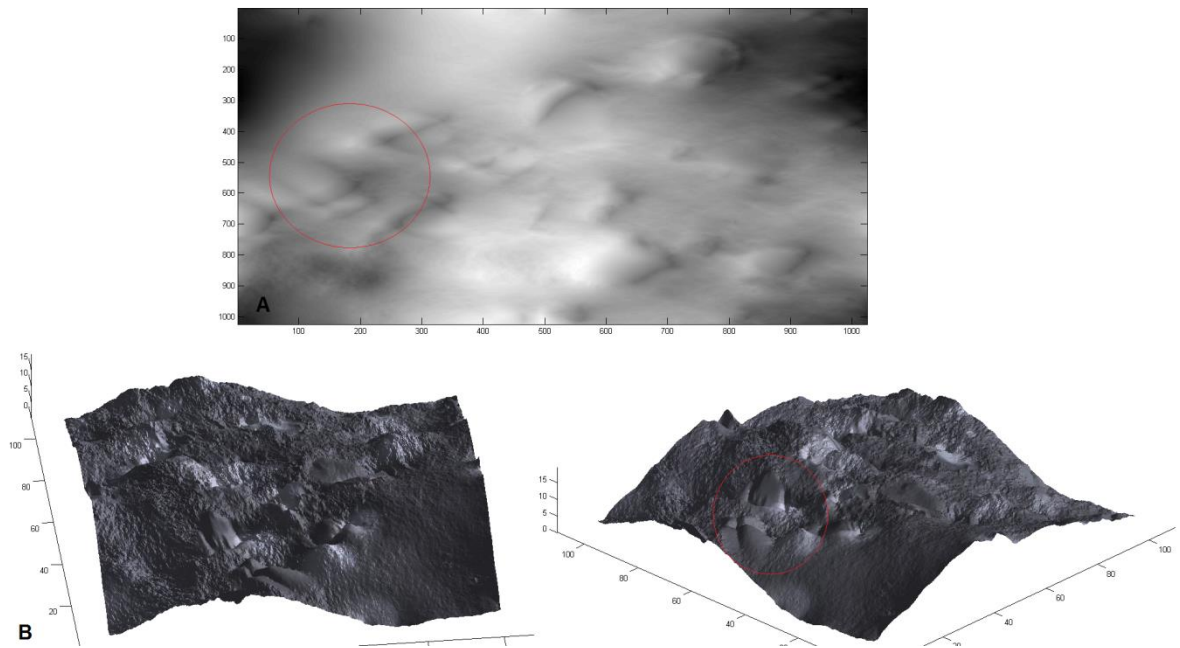
**Figura 42:** reconstrucción de micro-lentes de  $1.58 \mu\text{m}$  por algoritmo de focalización con criterio de varianza, visualización 3D realizada en Image J.

*Fuente: autor.*

Como se observa en las imágenes (figuras 40 y 41) al utilizar el método de recuperación de fase en espiral se consigue obtener información de la topografía de la muestra; para la función espiral de fase fueron utilizados los dos resultados de corrimiento lateral obtenidos en la calibración, sin embargo se consiguió un mejor resultado con el valor de  $0,4\mu\text{m}$ , valor cercano al obtenido en el proceso de calibración con la dispersión de esferas, el proceso de calibración de píxeles a milímetros en x-y arroja un error porcentual de 8.2% mientras en z es del 11%. En los resultados de la reconstrucción (figura 40 y 41) se pueden observar errores originados por defectos en la toma de imágenes ya que no se consigue que todo el campo de observación este en foco, pequeñas variaciones de altura en el soporte de la muestra conducen a que el plano de la muestra no sea completamente perpendicular al eje óptico del microscopio, otros problemas son originados por errores introducidos por el algoritmo utilizado, la calibración del desplazamiento lateral y como se evidencia en las figuras 43 y 44 las regiones que no están en foco contribuyen significativamente al error en la reconstrucción, haciendo necesario en trabajos futuros complementar este tipo de algoritmos con detección de máximos o algoritmos de focalización, algunos artefactos sobre la imagen son producidos por la falta de un filtro frecuencial que elimine componentes que no logran retirarse al tomar un solo plano de color en este caso se tomó el plano de color verde; sin embargo los resultados son prometedores ya que con el algoritmo basado únicamente en focalización (figura 42) utilizando como criterio de foco la varianza de la imagen, no fue posible obtener la topografía, esto se debe a que la resolución axial es cercana  $0,61\mu\text{m}$  para el objetivo de 100x (tabla 1), debido a esto aunque el barrido sea a pasos de 100 nm no se alcanza a obtener topografía de las micro-lentes.



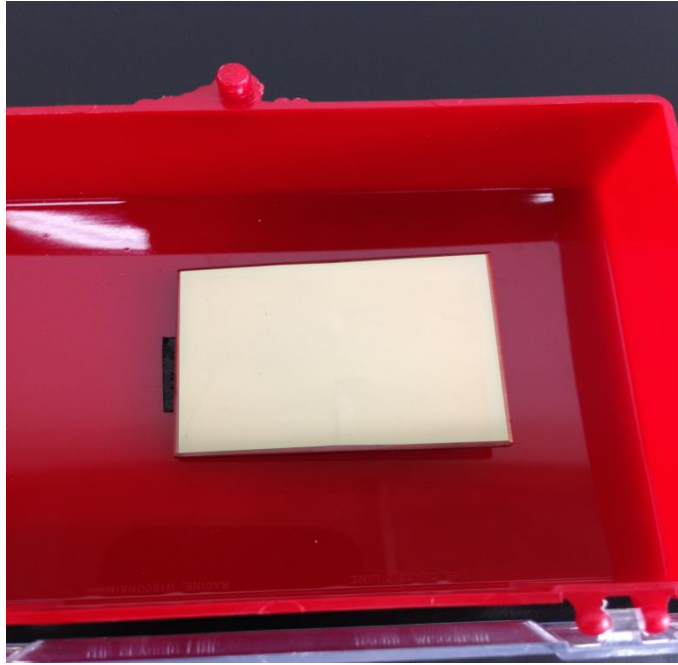
**Figura 43:** imagen de una dispersión de esferas de Estaño **A)** modo campo claro **B)** modo C-DIC, la muestra está en foco sobre la parte superior de las esferas con diámetro cercano a  $9\ \mu\text{m}$ , algunas de las esferas en esta región de la muestra están deformadas por defectos en su fabricación, la imagen fue tomada con un objetivo de  $100\times$ . *Fuente: autor.*



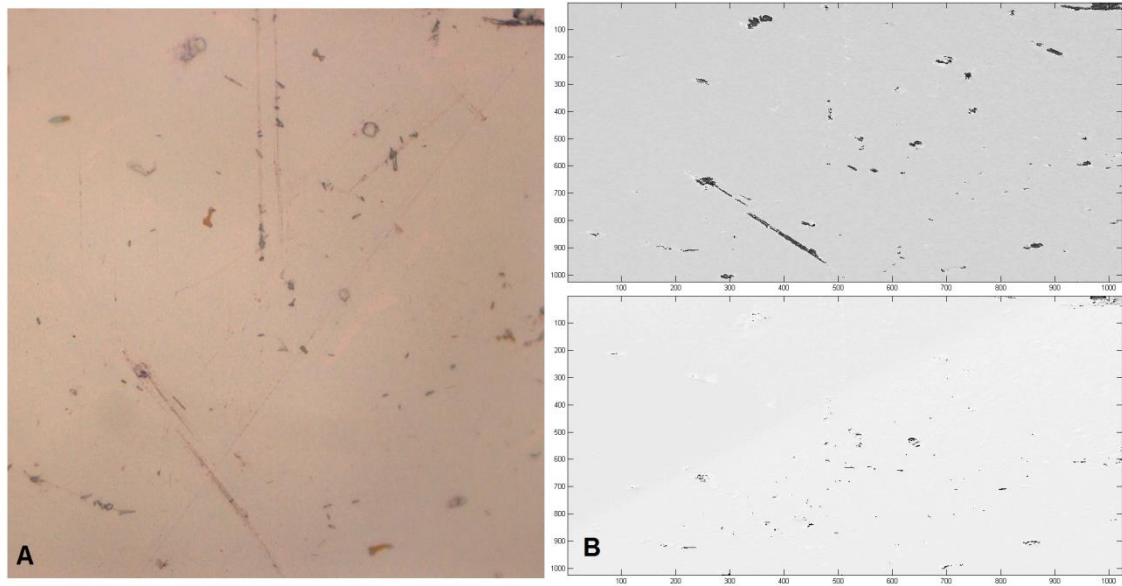
**Figura 44:** **A)** fase a partir de algoritmo de integración de fase en espiral con unidades de la imagen en pixeles, **B)** topografía obtenida de la dispersión de esferas, las unidades corresponden a micrómetros. *Fuente: autor.*

Como puede observarse en la figura 43, en el caso de objetos con topografía que supera la profundidad de campo del objetivo utilizado, es posible rescatar únicamente la información de las regiones en foco perdiendo la información de planos subyacentes. Sin cambiar el plano focal se aplicó el algoritmo de *phase shifting* junto con el de integración de fase en espiral, obteniendo los resultados mostrados en la figura 44, en círculos rojos se resalta la información recuperada de la muestra. El mismo proceso fue realizado para un biprisma de Fresnel al cual se le aplicó un recubrimiento de oro de aproximadamente  $50\mu\text{m}$  de espesor (figura45), posteriormente fue observado mediante microscopia de campo claro (figura46) y se siguieron los pasos 1-9 (figura46 a 48) de la metodología de adquisición de imágenes del capítulo 5.2, mostrando que se obtienen resultados de topografía consistentes con la geometría del prisma, la figura 46B de la parte

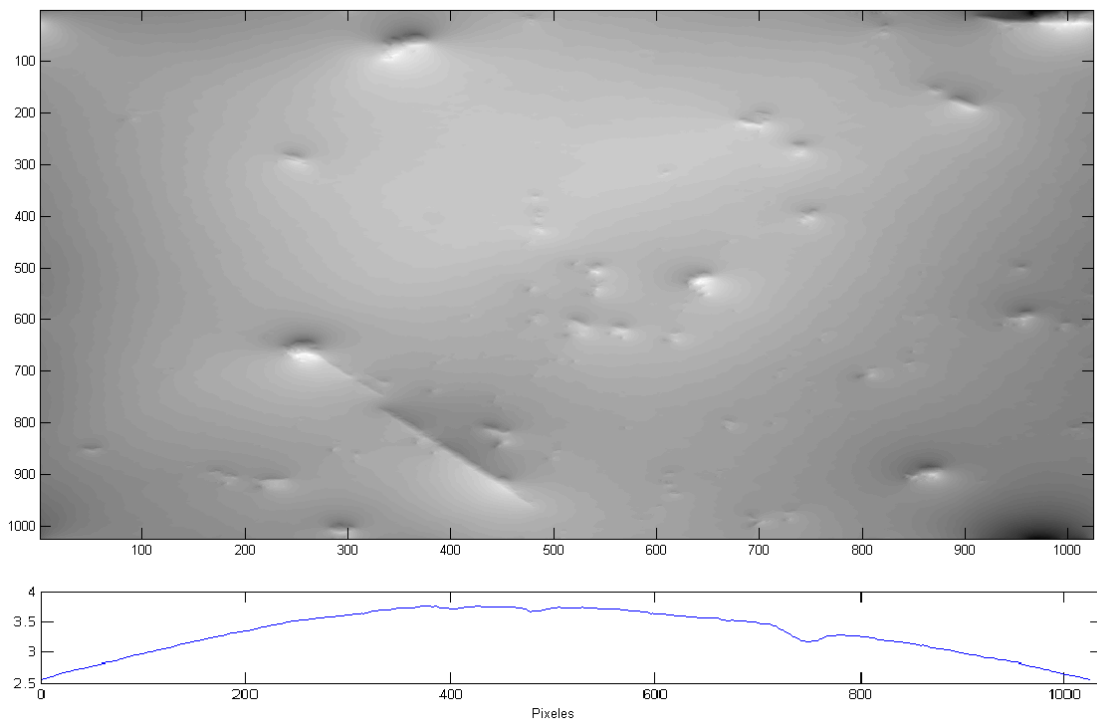
superior e inferior muestran que el sistema actúa como un filtro direccional ya que a pesar de observar la misma región del prisma, no se observan los mismo defectos en la superficie de la muestra cuando se orienta el *shift* en dos direcciones perpendiculares.



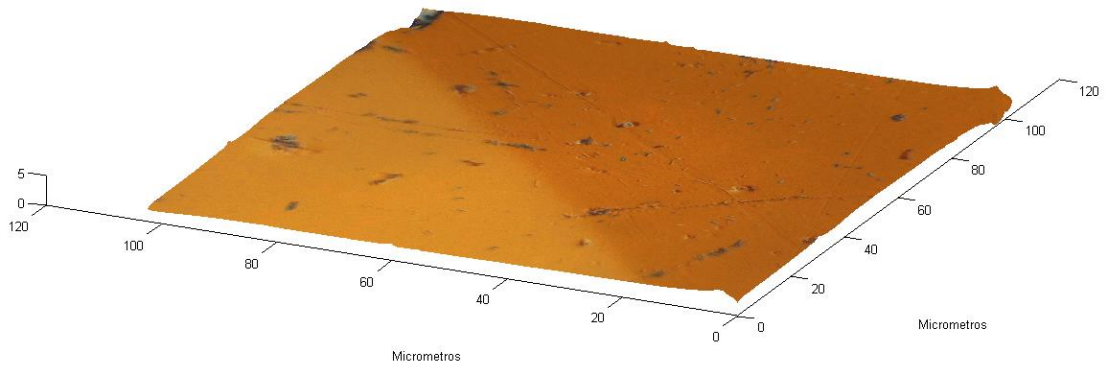
**Figura 45:** bi-prisma de Fresnel con recubrimiento de oro de aproximadamente 50 nm de espesor. *Fuente: autor.*



**Figura 46:** **A)** imagen del bi-prisma de Fresnel, tomada en modo de campo claro y con un objetivo de 100x, **B)** imágenes de *phase shifting* utilizadas para construir la función compleja, base del algoritmo de integración de fase en espiral. *Fuente:* autor.



**Figura 47:** fase obtenida a partir de *phase shifting* e integración de fase en espiral y su correspondiente perfil. *Fuente: autor.*



**Figura 48:** reconstrucción obtenida de la parte superior del bi-prisma de Fresnel, con ángulo entre los dos planos de 176 grados. *Fuente: autor.*

# CONCLUSIONES

---

1. Los algoritmos de recuperación de fase como *phase shifting* eliminan las variaciones de la intensidad procedentes de imágenes C-DIC, permitiendo obtener los gradientes de fase de la imagen, haciendo que la técnica sea útil para recuperar la topografía en muestras con variaciones del orden de micrómetros.
2. Es necesario emplear un filtro frecuencial ya que al separar la imagen en planos de color no se consigue eliminar completamente la influencia de las diferentes componentes frecuenciales que afectan la recuperación de la fase y por consiguiente impiden la reconstrucción de la muestra.
3. El algoritmo de integración por espiral de fase permite obtener, a partir de los gradientes de fase en dos direcciones mutuamente perpendiculares conocidas la fase continua, minimizando los errores producidos cuando se emplean métodos de integración unidireccional, sin embargo requiere establecer un método de calibración y este proceso también puede introducir errores en la fase resultante; Un patrón de calibración adecuado mejora el proceso de calibración del sistema, reduciendo el error en la fase obtenida;

4. Las regiones de la imagen fuera de foco introducen ruido y producen variaciones de fase indeseadas que impiden la reconstrucción de la muestra.
  
5. un método de calibración a considerar, consiste en crear un patrón regular en escalera realizado mediante técnicas de litografía que permita establecer diferentes cambios de altura en el patrón, sin embargo el proceso de calibración con esferas permitió observar aspectos ópticos de modelo interferométrico que allí ocurre y corroborar las afirmaciones establecidas en el desarrollo teórico de este trabajo.
  
6. La muestra debe recibir un recubrimiento para garantizar homogeneidad en el material y evitar cambios de fase por reflexión, sin este recubrimiento no hubiese sido posible observar el patrón de franjas y garantizar que un determinado corrimiento es debido a cambios en la topografía y no a cambios en el índice de refracción de la muestra.

# TRABAJOS FUTUROS

---

1. Con el fin de complementar esta técnica es posible combinarla con algoritmos de focalización que permitan obtener información de muestras con rugosidad superior a diez micras pero con detalles adquiridos por la técnica C-DIC menores a este rango.
2. El análisis realizado en este trabajo se hizo bajo el desarrollo de la óptica coherente ya que trabajos anteriores mostraron buenos resultados utilizando esta herramienta, sin embargo se pueden seguir buscando mejoras en los algoritmos de recuperación de fase a partir de gradientes de fase desde el punto de vista de la óptica incoherente.
3. Es posible utilizar la técnica para establecer cambios de fase en una muestra plana con el fin de determinar cambios en el índice de refracción del material de la muestra, pudiendo ser utilizado tanto para el análisis de películas delgadas como para determinar el crecimiento de cristales.
4. En este trabajo se realizó una calibración manual del sistema óptico, en trabajos futuros es posible realizar este proceso de calibración de forma automática reduciendo los errores generados por el tiempo de toma de datos, ya que como se mencionó en el trabajo la exposición prolongada de la muestra a la luz hace que esta sufra cambios por dilatación lo que dificulta mantener en foco la muestra.

# REFERENCIAS

---

- [1] C.Gifkins, Optical Microscopy of Metals, London, 1970, (Pitman), pg 13-44.
- [2] E. Hecht, Optica, Addison Wesley IberoAmericana, Madrid, 2000.
- [3] S.Frish, A. Timoreva, Curso de física general tomo 3, tercera edición, Mir, 1977.
- [4] R. Danz, P. Gretscher, C-DIC a new microscopy method for rational study of phase structures in incident light arrangement, Thin Solid Films 462–463 (2004).
- [5] M.Gaylord, Analisis and design of modified Wollaston prisms, Applied Optics, Vol.38, No 31, 1999.
- [6] R. Azzam, N. Bashara, ellipsometry and polarized light, Elsevier, 1977.
- [7] A Bonilla, A Weidner, Estudio y diseño de dos interferómetros de polarización para la observación de objetos por reflexión, Tesis Msc, 2008.
- [8] S King, C. Cogswell, R. Piestun, Quantitative phase information from differential Interference Contrast Microscopy, Doctoral Thesis, University of Colorado, 2008.
- [9] Goldberg and J. Bokor, Fourier-transform method of phase-shift determination, Applied Optics, Vol. 40, No 17, June 2001.
- [10] M. Arnison, K. Larkin, C. Sheppard, N. Smith, C. Cogswell, Linear phase imaging using differential interference contrast microscopy, Journal of Microscopy, Vol. 214, pp. 7–12, 2004.

- [11] K. Larkin, D. Bone, M. Oldfield, Natural demodulation of two-dimensional fringe patterns. I. General background of the spiral phase quadrature transform, OSA. A / Vol. 18, No 8, 2001.
- [12] Calibration\_Standards Catalogo disponible en: ( [http://www.agarscientific.com/pages/catalogue-8/03\\_Calibration\\_Standards\\_pgs\\_39-84\\_date\\_17\\_06\\_10\\_web.pdf](http://www.agarscientific.com/pages/catalogue-8/03_Calibration_Standards_pgs_39-84_date_17_06_10_web.pdf) ).
- [13] C. Meneses,U. Rivera, Phase-Shifting interferometry by amplitude modulation, facultad de ciencias físico-matematicas, Mexico,(2011).
- [14] Sheng-Kang Yu,Wei-Lun Chen, Ting-Kun Liu, Shih-Chieh Lin. Profile measurement of transparent inclined surface with transmitted differential interference contrast shearing interferometer, Optics Express 19868,Vol.20, No.18 ,august 2012.
- [15] X. Cui, M. Lew, and C Yang, Quantitative differential interference contrast microscopy based on structured-aperture interference, Applied Physics Letters 93, 091113,2008.
- [16] C. Preza, D. Snyder, J Conchello, Imaging models for three-dimensional transmitted-light DIC microscopy, Imaging Science and Technology, Spie 1996.
- [17] Microscopio Electrónico Quanta 650 Disponible en: ( [http://www.fei.com/uploadedFiles/DocumentsPrivate/Content/2009\\_03\\_Quanta\\_650\\_ds.pdf](http://www.fei.com/uploadedFiles/DocumentsPrivate/Content/2009_03_Quanta_650_ds.pdf)).
- [18] C. Preza, D Snyder, J. Conchello, Image reconstruction for three-dimensional transmitted-light DIC microscopy,SPIE 3D Image Acquisition and Processing IV 2984-24 1997.
- [19] K. Dana, Three-Dimensional reconstruction of the tectorial membrane: An Image Processing Method using Nomarski Differential Interference Contrast Microscopy.Massachusetts Institute of Technology,Thesis Master of Science,1992.

- [20] AxioImagerZ1m Disponible en: ( [http://www.sheerinscientific.com/product/axioimagermat\\_46-0047\\_e.pdf](http://www.sheerinscientific.com/product/axioimagermat_46-0047_e.pdf) ).
- [21] Q Wu, Fatima Merchant, K Castleman, Microscope Image Processing, Academic Press, Elsevier, 2008.
- [22] K Medicus, L Fricke, J Brodziak, S Carnevale, M Chaney, R Wolff, A Davies, The Effect of Phase Change on Reflection on Optical Measurements, Proceedings of the SPIE, Volume 5879, pp. 61-72, 2005.
- [23] Carl Zeiss MicroImaging GmbH. disponible en: ( [http://www.zeiss.de/C12574750032E818/EmbedTitelIntern/TIC/\\$File/tic\\_e.pdf](http://www.zeiss.de/C12574750032E818/EmbedTitelIntern/TIC/$File/tic_e.pdf) ).
- [24] E. Palik, Handbook of optical constants of solids II, Elsevier Science, USA, 1998.