



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Métodos de cuantificación de fase a partir de mediciones de intensidad en microscopía holográfica digital sin lentes

Juan Pablo Piedrahita Quintero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Física
Medellín, Colombia

2018

Métodos de cuantificación de fase a partir de mediciones de intensidad en microscopía holográfica digital sin lentes

Juan Pablo Piedrahita Quintero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias – Física

Director:

PhD Jorge Iván García Sucerquia

Línea de investigación:

Microscopía holográfica digital sin lentes

Grupo de Investigación:

Óptica y procesamiento opto-digital

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Física
Medellín, Colombia

2018

Puedo vivir con dudas e incertidumbre y sin saber. Creo que es mucho más interesante vivir sin saber, que teniendo respuestas que podrían estar equivocadas. [...] no me siento espantado por no saber cosas, por estar perdido en un universo misterioso sin tener ningún propósito.

Richard Feynman

Agradecimientos

Primero que todo, quiero agradecer al profesor Jorge Iván García Sucerquia no sólo por el conocimiento académico impartido, sino por la formación integral que he recibido de su parte, también por la paciencia y comprensión que fueron necesarias para llevar a buen término esta tesis de Maestría en Ciencias – Física.

A mis compañeros de estudio y del grupo de Óptica y procesamiento opto-digital de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, en especial a Raúl Castañeda y Carlos Trujillo, por el interés y las discusiones generadas alrededor de este trabajo.

A mis padres por estar siempre atentos y dispuestos a ayudarme en lo que fuera necesario. A mi madre por su incansable acompañamiento y siempre animarme a seguir adelante a pesar de las dificultades encontradas y a mi padre por ser un ejemplo a seguir.

A mi familia y mis amigos que estuvieron a mi lado durante el desarrollo de este trabajo.

Por último, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, a Colciencias y a la Fundación BANREPUBLICA por el financiamiento recibido para realizar este trabajo.

Resumen

Esta tesis de Maestría en Ciencias – Física se establece una base sólida para el desarrollo futuro de algoritmos iterativos de recuperación de fase a partir de mediciones de intensidad en microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM). Además, se estudia la influencia de diferentes factores críticos cuando se aplica una metodología iterativa de recuperación de fase en DLHM y los problemas asociados a ellos. Por último, se evidencia que los algoritmos de recuperación de fase aplicables a DLHM representan un campo poco explorado y que merece ser estudiado con mayor profundidad, pues pueden convertir DLHM en una técnica no invasiva y de alto impacto para el análisis de muestras transparentes con potencial para ser una tecnología portátil y de bajo costo. Algunos de los resultados de esta tesis se consignaron en cinco artículos en revistas internacionales, cinco ponencias nacionales e internacionales e implementados en dos softwares registrados.

Palabras clave: Microscopía holográfica digital sin lentes, Imágenes cuantitativas de fase, Algoritmos de recuperación de fase.

Abstract

This master thesis in Sciences-Physics establishes a solid base for future developments in iterative phase retrieval algorithms suitable for digital lensless holographic microscopy (DLHM). Besides, it studies the influence of various critical factors when it comes to applying iterative phase retrieval methodologies to DLHM and the issues that arise from it. Also, it shows that the suitable phase retrieval algorithms for DLHM represent a relatively unexplored field that deserves to be studied with greater depth, because it can turn DLHM into a high impact non-invasive technic for the analysis of transparent samples with potential to become low-cost and portable technology. Some of the results of this thesis have been published in five archival Journals, presented in five conferences and implemented in two registered software.

Keywords: Digital Lensless Holographic Microscopy, Quantitative Phase Imaging, Phase retrieval algorithms.

Contenido

	Pág.
Introducción	1
1. Microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM)	7
1.1. Registro.....	7
1.2. Reconstrucción	9
1.2.1 Transformada de Fresnel – Bluestein	11
1.2.2 Patente Universidad Nacional de Colombia	14
1.2.3 Preparación del holograma	17
1.3. Apertura numérica y resolución	21
1.4. Medidas cuantitativas de fase	24
2. Métodos de recuperación de fase a partir de medidas de intensidad (RFMI) ...	31
2.1. Algoritmo Gerchberg-Saxton (GS) y de Reducción de Error (RE)	32
2.2. Algoritmos de entrada-salida (ES).....	38
2.3. Algoritmo de Rong.....	41
2.3.1 Influencia de la función de soporte.....	46
2.3.2 Influencia del parámetro de relajación	47
2.4. Comparación de los diferentes métodos de RFMI	50
3. RFMI en DLHM (ondas esféricas y $AN > 0,3$)	53
3.1. El problema de RFMI con iluminación de ondas esféricas en DLHM.....	54
3.2. Muestreo de la onda de referencia	54
3.3. Distancia de reconstrucción	61
3.4. Propuesta de RFMI con iluminación de ondas esféricas en DLHM	64
3.5. Discusión de resultados	70
4. Conclusiones y perspectivas	75
4.1. Conclusiones.....	75
4.2. Perspectivas.....	77
Bibliografía	79

Lista de figuras

- Figura 1-1: Esquema simplificado de la configuración de registro en DLHM. P: pinhole, S: muestra, C: medio de registro digital, Línea continua: haz de referencia y Línea discontinua: haz objeto..... 8
- Figura 1-2: Sistemas coordenados en los planos de registro (holograma) y reconstrucción (muestra)..... 10
- Figura 1-3: Mallas coordenadas antes (azul) y después (rojo) de realizar el cambio de coordenadas. 16
- Figura 1-4: Holograma y referencia capturados para unas esferas de poliestireno de $1 \mu\text{m}$ de diámetro. (a) Intensidad registrada con la muestra presente (holograma). (b) Intensidad registrada sin muestra (referencia)..... 19
- Figura 1-5: Hologramas de contraste. (a) Calculado usando la Ecuación (1.27). (b) Calculado usando la Ecuación (1.28). 20
- Figura 1-6: Hologramas interpolados, se muestran la malla uniforme (verde) y la malla con forma de barril (rojo) superpuestas en los hologramas. (a) Holograma de la Figura 1-5 (a) interpolado. Holograma de la Figura 1-5 (b) interpolado..... 20
- Figura 1-7: Reconstrucción de los hologramas interpolados en la Figura 1-6 usando el plugin *Digital Lensless Holographic Microscopy* [88]. 21
- Figura 1-8: Reconstrucciones en intensidad para hologramas simulados con dos objetos puntuales. (a), (b) y (c) reconstrucciones en intensidad. (d), (e) y (f) perfiles de intensidad tomados a lo largo de las líneas azules en los cuadros (a), (b) y (c), respectivamente... 23
- Figura 1-9: Reconstrucción en intensidad y fase de las esferas de poliestireno registradas en el holograma de la Figura 1-4 (a). (a) Intensidad. (b) Fase..... 25
- Figura 1-10: (a) Holograma sencillo. (b) Intensidad de la onda de referencia (sin muestra). (c) Reconstrucción en fase para (a), representa $\phi_o(\mathbf{r}')$. (d) Reconstrucción en fase para (b), representa $\phi_r(\mathbf{r}')$ 26
- Figura 1-11: Mapa de fase obtenido para el holograma en la Figura 1-10 (a) después de realizar la resta de fases con módulo 2π 27
- Figura 1-12: Simulación del proceso de registro para una distribución de fase conocida. (a) Holograma sencillo. (b) Intensidad de la onda de referencia (sin muestra). (c)

Reconstrucción en fase para (a), representa $\phi_o(r')$. (d) Reconstrucción en fase para (b), representa $\phi_R(r')$	28
Figura 1-13: (a) Distribución de fase introducida en la simulación. (b) Distribución de fase recuperada usando el procedimiento previamente descrito.	29
Figura 2-1: Esquema para el algoritmo Gerchberg-Saxton (GS).	34
Figura 2-2: Simulación de los registros de amplitud necesarios para aplicar el algoritmo GS. (a) Distribución de amplitud del objeto (Lena). (b) Distribución de fase del objeto (Oso). (c) Distribución de amplitud en el plano de difracción.	35
Figura 2-3: Resultados del algoritmo GS para las imágenes de entrada en la Figura 2-2. (a) y (b) Amplitud y fase recuperadas a través de reconstrucción directa. (c) y (d) Amplitud y fase recuperadas después de 500 iteraciones.	36
Figura 2-4: Diagrama de bloques para el algoritmo de reducción de error.	38
Figura 2-5: Error cuadrático medio para las imágenes de entrada en los cuadros (a) y (c) de la Figura 2-2.	38
Figura 2-6: Diagrama de bloques para el algoritmo de entrada-salida [103].	39
Figura 2-7: Esquema simplificado de la configuración de registro en un sistema holográfico en línea con ondas planas. BE: expansor de haz, S: muestra, C: medio de registro digital, Línea continua: haz de referencia y Línea discontinua: haz objeto.	42
Figura 2-8: Reconstrucción de un holograma normalizado obtenido usando el holograma de la simulación presentada en la Figura 2-2. (a) Holograma normalizado. (b) y (c) Reconstrucción en amplitud y fase, respectivamente, del holograma normalizado.	43
Figura 2-9: Medidas recuperadas a partir del holograma simulado que se presenta en la Figura 2-8 (a). (a) Función de soporte que coincide con el tamaño del objeto. (b) y (c) Amplitud y fase recuperadas usando el algoritmo de Rong et al después de 500 iteraciones.	45
Figura 2-10: Resultados de las pruebas para diferentes tamaños de la función de soporte para el holograma simulado que se presenta en la Figura 2-8 (a). (a) Error cuadrático medio para diferentes tamaños de la función de soporte. (b) Función de soporte para $1,5x$. (b) y (c) Amplitud y fase recuperadas usando el algoritmo después de 800 iteraciones.	47
Figura 2-11: Resultados de las pruebas para diferentes valores del parámetro de relajación ρ con diferentes cambios de fase máximos $\Delta\phi$ introducidos por el objeto. (a) $\Delta\phi_{\text{máx}} = 3\pi/4$. (b) $\Delta\phi_{\text{máx}} = \pi$. (c) $\Delta\phi_{\text{máx}} = 2\pi$	49
Figura 3-1: Fase de una onda esférica. (a) Fase original (desenvuelta). (b) Fase recuperada con la Ecuación (3.1) (envuelta).	55

- Figura 3-2: Fase esférica simulada usando parámetros típicos de DLHM ($AN = 0,46$). En el recuadro rojo se puede observar el fenómeno de *aliasing* debido al submuestreo de la señal. 56
- Figura 3-3: Soluciones de las desigualdades en las Ecuaciones (3.5) y (3.6) como función de los diferentes parámetros de interés. 58
- Figura 3-4: (a) Mapa de fase que representa el objeto. (b) Fase $\phi_o(\mathbf{r}')$ del campo propagado con muestra. (c) Fase $\phi_R(\mathbf{r}')$ del campo propagado sin muestra. (d) Fase obtenida después de realizar la resta módulo 2π 60
- Figura 3-5: Simulación para objetos puntuales distribuidos en una espiral. (a) Holograma de contraste total. (b) Vista tridimensional de las posiciones originales y de reconstrucción. (c) y (d) Vistas bidimensionales de las posiciones en los planos xy y zy . La línea punteada gris representa el eje óptico del sistema y la caja punteada roja representa el cono de proyección del medio de registro hacia la fuente de iluminación. 63
- Figura 3-6: Simulación del proceso de registro de un holograma en DLHM con un objeto puro de fase. (a) Fase del objeto. (b) Holograma simulado. 67
- Figura 3-7: Resultados obtenidos con el algoritmo iterativo propuesto para DLHM. (a), (c) y (e) Imágenes de amplitud. (b), (d) y (f) Imágenes de fase. 68
- Figura 3-8: Resultados obtenidos después de 50 iteraciones usando como entrada la intensidad de la onda de referencia. (a) Amplitud. (b) Fase..... 69
- Figura 3-9: Resultados obtenidos con la propuesta modificada para el algoritmo iterativo de recuperación de fase en DLHM. (a), (c) y (e) Imágenes de amplitud. (b), (d) y (f) Imágenes de fase..... 70
- Figura 3-10: Resultados obtenidos al propagar una imagen compuesta por valores iguales a 1 en todos los puntos utilizando los métodos de difracción utilizados en DLHM. 72
- Figura 3-11: Resultados obtenidos al propagar una imagen compuesta por valores iguales a 1 en todos los puntos utilizando diferentes métodos numéricos de difracción clásicos. 72

Introducción

Las mediciones cuantitativas de fase (QPI) juegan un papel fundamental en diversas técnicas de formación de imágenes porque permiten cuantificar diferentes variables fisicoquímicas en muestras transparentes [1]. Las muestras transparentes son de gran importancia en diversos campos de ciencia y tecnología porque dentro de ellas se encuentran por ejemplo tejidos biológicos, aerosoles, materias primas de la industria cosmética y farmacéutica, entre otras. La herramienta comúnmente utilizada para el estudio de muestras transparentes es el tinte de ellas por medio de sustancias químicas que las haga visibles a instrumentos de medida como los microscopios de luz compuesta. Esta práctica tiene el inconveniente de introducir perturbaciones y contaminación en las muestras, llevando en algunos casos a la muerte de los especímenes biológicos y de esta manera imposibilitando estudios dinámicos de los mismos. La gran ventaja de las técnicas de QPI es que al ser técnicas no invasivas remueven la necesidad de teñir las muestras [1–4] e incluyen un gran rango de aplicaciones, dentro de las cuales se pueden destacar el diagnóstico de células vivas [5–8], rastreo de partículas [9–13], estudios de la estructura y dinámica celular [14–16], diagnóstico de enfermedades [17–19], pruebas de sangre [20–23], mediciones de índices de refracción [24–27], entre otras [28–34].

Actualmente existe una gran cantidad de técnicas de QPI como por ejemplo microscopía de cuadratura óptica (OQM) [35,36], microscopía de fase de Fourier (FPM) [37,38], microscopía de difracción de fase (DPM) [15], microscopía de interferencia espacial de luz (SLIM) [39,40], tomografía de interferencia espacial de luz (SLIT) [41], microscopía holográfica digital (DHM) [2,5,42], microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM) [43–47], entre otras [1,34]. Todas las técnicas mencionadas, a excepción de DLHM, utilizan sistemas ópticos complejos y debido a esto, requieren gran estabilidad mecánica y entornos con variables controladas, estas características las convierten en herramientas costosas y no portátiles debido a su gran tamaño. Es en este punto donde realmente se

destaca DLHM, al tener una configuración óptica sencilla y no requerir un entorno controlado, se perfila como una tecnología con proyección para ser portátil y de bajo costo, algo que sería realmente útil para hacer QPI y sus aplicaciones accesibles a un grupo mayor de profesionales en ciencia y tecnología y, además, permitir la realización de estudios de fase en campo.

DLHM es una técnica de formación de imágenes en dos pasos, primero se lleva a cabo una etapa experimental donde se registran patrones de intensidad llamados hologramas y una segunda etapa de procesamiento digital de estos hologramas, llamada reconstrucción, donde se decodifica la información contenida en ellos [45,46]. En la etapa de registro, el objeto que se desea estudiar es iluminado por una onda esférica, conocida como onda de referencia, y un sensor digital registra el patrón de difracción que se genera cuando la onda esférica es esparcida en la muestra. En la etapa de reconstrucción, se simula el proceso de difracción que sufre una onda esférica al iluminar el holograma registrado y ser esparcida, de esta manera el holograma actúa como si fuera una rejilla de difracción. El campo óptico que se obtiene en el proceso de reconstrucción está compuesto por tres órdenes: el orden cero que incluye la intensidad de la onda de referencia y de la onda objeto y los órdenes $+1$ y -1 que contienen, cada uno, la información completa del objeto, esto es, amplitud y fase [48]. En general, se desea obtener solamente la información contenida en uno de los órdenes, $+1$ o -1 , y filtrar el resto de información, por ejemplo, si se desea obtener la información contenida en el orden $+1$ entonces debe filtrarse la información del orden cero y el orden -1 .

En algunas técnicas holográficas este proceso de filtrado se realiza introduciendo un ángulo entre la onda de referencia y la onda esparcida por el objeto, este procedimiento recibe el nombre de holografía fuera de eje [49–51]. Al introducir este ángulo entre las dos ondas, se separan espectralmente los órdenes y se puede elegir el orden deseado usando un filtro pasa banda [52]. Otra técnica comúnmente utilizada es *phase shifting* [53–55], en esta técnica se registran varios hologramas introduciendo diferentes cambios de fase conocidos en la onda de referencia y posteriormente por medio de operaciones matemáticas sencillas se puede obtener la información completa del objeto. Estas técnicas permiten recuperar de manera sencilla la información del objeto contenida en el holograma y a su vez reducen la carga computacional para lograrlo, pero todo esto se logra a cambio de un incremento en la complejidad en el sistema de registro. Una alternativa a los métodos

anteriormente mencionados, son los métodos iterativos de recuperación de fase [56–59], estos métodos utilizan cálculos de difracción numérica sucesivos entre dos planos, aplicando condiciones en cada uno, con el fin de eliminar los órdenes no deseados. La gran ventaja de estas metodologías respecto a las anteriores es que no requieren la introducción de nuevos elementos ópticos en el sistema de registro, por lo cual existen diversos reportes exitosos de la aplicación de estas metodologías a sistemas holográficos [60–64].

En el estado actual de DLHM, la información que se obtiene del proceso de reconstrucción de los hologramas sigue conteniendo los otros órdenes de difracción. Este problema dificulta el uso de DLHM como una técnica de QPI que permita obtener medidas confiables a partir de las cuales se puedan estudiar diferentes objetos transparentes. En DLHM existen dos reportes de metodologías que intentan dar solución a este problema. El primero realizado por Jericho et al. [65], en el cual se eliminan los factores de fase esféricos introducidos por la onda de referencia, pero el orden -1 , conocido también como imagen gemela, sigue estando presente en los mapas de fase recuperados [66,67]. El segundo reporte, hecho por Bao et al. [68], utiliza metodologías iterativas como las que se mencionaron anteriormente pero requiere múltiples registros de hologramas con diferentes longitudes de onda, lo cual incrementa la complejidad experimental de DLHM, además de esto, para nosotros no ha sido posible reproducir los resultados reportados para esta técnica, a pesar de haber contactado a los autores con el fin de obtener su asistencia.

La no existencia de una metodología que permita recuperar mediciones cuantitativas de fase confiables en DLHM a partir de registros de intensidad (hologramas) y el éxito de las metodologías iterativas en otros sistemas holográficos, motivan la decisión de querer implementar estas técnicas iterativas dentro de la arquitectura de DLHM. Encontrar una solución efectiva al problema de recuperación de fase en DLHM, es un paso más para cumplir el objetivo de convertir DLHM en una tecnología capaz de competir con las demás técnicas de QPI, convirtiéndola en una alternativa con un costo y un tamaño extremadamente reducido cuando se compara con ellas, incrementando así la relación costo/calidad de los resultados para DLHM.

Este texto de tesis de Maestría en Ciencias – Física intenta realizar una propuesta de solución para el problema de recuperación de fase en DLHM. En el capítulo 1 se hace una

introducción a DLHM, describiendo la etapas de registro y reconstrucción, necesaria para entender las características experimentales requeridas por DLHM y las implicaciones que esto tiene sobre los métodos numéricos de difracción utilizados en el proceso de reconstrucción, también se muestran los resultados obtenidos utilizando la técnica propuesta por Jericho et al. ya que puede servir como una primera estimación para la implementación de un método iterativo en DLHM. En el capítulo 2 se exponen las diferentes clasificaciones que existen para las metodologías iterativas de recuperación de fase, se expone la técnica propuesta por Rong et al. como una base sólida para la implementación de un algoritmo iterativo en DLHM debido a sus resultados y, además, se estudia la influencia de sus parámetros en la convergencia y la calidad de los resultados obtenidos, el capítulo finaliza con una comparación entre los diferentes métodos previamente expuestos. En el capítulo 3 se realiza una propuesta de un método iterativo de recuperación de fase en DLHM, se presentan los resultados obtenidos usando simulaciones y se realiza una discusión de los mismos. Por último, en el capítulo 4 se concluye la tesis y se mencionan las perspectivas y la importancia del trabajo realizado.

Los resultados que se derivaron de esta tesis de Maestría en Ciencias – Física han sido reportados en artículos científicos publicados en revistas de circulación internacional como: "Image processing and computing for digital holography with ImageJ" en la revista Óptica Pura y Aplicada [69]; "Numerical wave propagation in ImageJ" en la revista Applied Optics [70]; "Automatic full compensation of quantitative phase imaging in off-axis digital holographic microscopy" en la revista Applied Optics [71]; "JDiffract: A GPGPU-accelerated JAVA library for numerical propagation of scalar wave fields" en la revista Computer Physics Communications [72] y "Off-axis digital holography simulation in ImageJ" en la revista Optik [73]. Además, el software Numerical Propagation tiene registro número 13-50-214 ante el Ministerio del Interior de Colombia y el registro del software Digital Lensless holographic Microscopy se encuentra actualmente en trámite ante la misma entidad. También se realizaron participaciones en eventos científicos de nivel nacional e internacional como: el poster "Numerical Diffraction in Java" presentado en el evento FOCUS Latinoamérica 2014, realizado en la ciudad de Medellín, Colombia; el poster "Numerical Wave Propagation plugin for ImageJ" presentado en el evento XVII Giambiagi Winter School, realizado en la ciudad de Buenos Aires, Argentina; el poster "Numerical Wave Propagation plugin for ImageJ" presentado en el evento XXVI Congreso Nacional de Física, realizado en la ciudad de Manizales, Colombia; el poster "Numerical

Wave Propagation plugin for ImageJ” presentado en el evento XIV Encuentro Nacional de Óptica y V Conferencia Andina y del Caribe en Óptica y sus Aplicaciones, realizado en la ciudad de Cali, Colombia y la presentación oral “Numerical Wave Diffraction in Java and ImageJ” presentada en el evento IONS Bogotá 2017 realizado en la ciudad de Bogotá, Colombia.

1. Microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM)

La microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM) es una técnica de formación de imágenes fundamentada en los principios de la holografía originalmente propuestos por Gabor [74]. DLHM hace uso de la propuesta de Gabor con la adición del registro digital y el procesamiento numérico, para producir las imágenes en dos pasos, una etapa de registro, donde se almacena la información utilizando un sensor digital y una de reconstrucción, donde se procesan numéricamente los datos registrados [43,45]. La gran ventaja de DLHM respecto a las demás técnicas de microscopía, es que DLHM tiene potencial recuperar toda la información de un campo óptico (amplitud y fase) con una baja complejidad experimental. En una gran variedad de aplicaciones, el interés se centra en la información de fase porque con esta se pueden cuantificar diferentes variables fisicoquímicas en muestras transparentes permitiendo aplicaciones biológicas y tecnológicas [1,5,28,75,76].

1.1. Registro

En la realización experimental, DLHM presenta grandes ventajas en términos de su complejidad experimental; DLHM no necesita un sistema formador de imágenes para realizar la magnificación de la muestra, sino que en cambio, se magnifica el patrón de difracción por medio de la propagación en el espacio libre [44,45,47]. En la Figura 1-1 se representa de manera esquemática el montaje experimental necesario en la etapa de registro de DLHM. Este montaje se puede entender de la siguiente manera: un haz de luz coherente (LASER), con longitud de onda λ , incide en un agujero (P) con diámetro del orden de la longitud de onda, este agujero se puede identificar como una fuente puntual. La onda esférica producida por la fuente puntual ilumina una muestra (S) ubicada a una distancia z de la fuente puntual, produciendo un patrón de difracción que al propagarse

en el espacio libre se registra en un sensor digital (C) ubicado a una distancia L medida desde la fuente puntual [45,46]. Las distancias z y L tienen valores típicos que se encuentran en el orden de μm y mm , respectivamente, produciendo magnificaciones del patrón de difracción del orden de 1000. El medio de registro puede ser una cámara CCD o CMOS, dependiendo de los requerimientos experimentales.

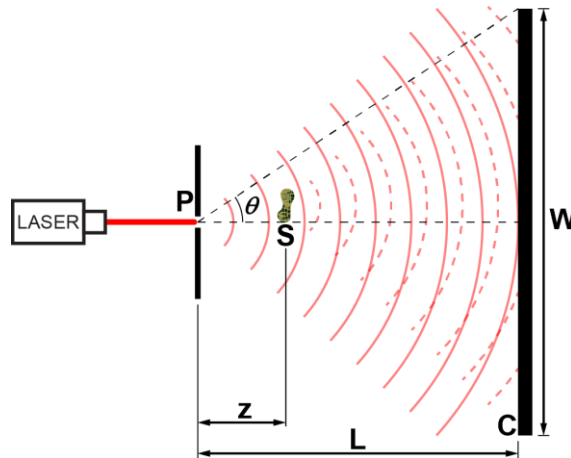
El patrón de difracción registrado en intensidad por la cámara digital se conoce como holograma. Este patrón se puede entender como la superposición coherente de la luz esparcida por la muestra, $O(\mathbf{r})$, y la onda no perturbada, $R(\mathbf{r})$, donde el vector $\mathbf{r} = (x, y, L)$ representa un vector posición en el plano de registro. $O(\mathbf{r})$ y $R(\mathbf{r})$, también se conocen como ondas objeto y referencia, respectivamente. El holograma registrado está dado entonces por

$$H(\mathbf{r}) = |R(\mathbf{r}) + O(\mathbf{r})|^2 \quad (1.1)$$

$$= [R^2(\mathbf{r}) + O^2(\mathbf{r})] + R^*(\mathbf{r})O(\mathbf{r}) + R(\mathbf{r})O^*(\mathbf{r})$$

donde * denota el complejo conjugado. El primer término, encerrado en corchetes, de la segunda línea de la Ecuación (1.1) se conoce como el orden cero de difracción, el segundo y el tercer término son llamados los órdenes ± 1 de difracción [48].

Figura 1-1: Esquema simplificado de la configuración de registro en DLHM. P: pinhole, S: muestra, C: medio de registro digital, Línea continua: haz de referencia y Línea discontinua: haz objeto.



La simplicidad experimental de DLHM la hace una técnica atractiva con capacidad de convertirse en una herramienta portátil y de bajo costo para el estudio en campo de muestras industriales y biológicas. Sin embargo, el precio que se debe pagar por sus pocas exigencias experimentales es un incremento de la complejidad computacional de las metodologías utilizadas convencionalmente para recuperar la información codificada en el holograma registrado.

1.2. Reconstrucción

La etapa de reconstrucción es donde la información del objeto, $O(\mathbf{r})$, que se encuentra codificada en el holograma es recuperada. Para hacer esto, se considera la reconstrucción como el proceso de difracción que sufre una onda esférica similar a la onda de referencia, $R(\mathbf{r})$, cuando ilumina el holograma digital, descrito en la Ecuación (1.1). Este proceso de difracción puede ser realizado utilizando la ecuación de onda escalar [48]. La ecuación de onda escalar puede solucionarse de distintas maneras para obtener la integral de difracción escalar, una de ellas, es la fórmula de difracción de Fresnel-Kirchhoff [48]

$$A_{\text{out}}(\mathbf{r}') = -\frac{i}{2\lambda} \iint_{\text{Sensor}} A_{\text{in}}(\mathbf{r}) \frac{\exp[ik|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|]}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} (1+\cos\chi) d\mathbf{r}, \quad (1.2)$$

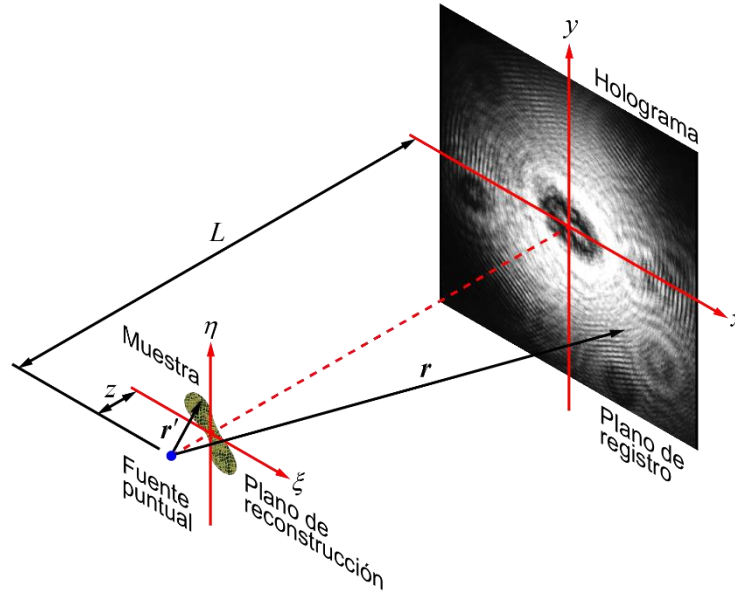
en esta fórmula, el frente de onda complejo de salida, $A_{\text{out}}(\mathbf{r}')$, se obtiene por la propagación del campo de entrada, $A_{\text{in}}(\mathbf{r})$. En la Ecuación (1.2), $k = 2\pi/\lambda$ es la magnitud del vector de onda con λ la longitud de onda de la iluminación; los vectores $\mathbf{r} = (x, y, 0)$ y $\mathbf{r}' = (\xi, \eta, z)$ denotan posiciones en los planos de entrada y salida, respectivamente (ver Figura 1-2). $(1+\cos\chi)$ es el factor de oblicuidad con χ siendo el ángulo entre un vector normal al plano de entrada y el vector $\mathbf{r}-\mathbf{r}'$; $i = \sqrt{-1}$ es la unidad imaginaria.

Del frente de onda de salida, $A_{\text{out}}(\mathbf{r}')$, se puede obtener información de amplitud y fase teniendo en cuenta que es una función compleja que depende de las coordenadas. La amplitud puede ser calculada como

$$|A_{\text{out}}(\mathbf{r}')| = [\text{Re}^2\{A_{\text{out}}(\mathbf{r}')\} + \text{Im}^2\{A_{\text{out}}(\mathbf{r}')\}]^{1/2} \quad (1.3)$$

y la información de fase como

Figura 1-2: Sistemas coordenados en los planos de registro (holograma) y reconstrucción (muestra).



$$\phi(\mathbf{r}') = \arctan \left[\frac{\text{Im}\{A_{\text{out}}(\mathbf{r}')\}}{\text{Re}\{A_{\text{out}}(\mathbf{r}')\}} \right]. \quad (1.4)$$

La Ecuación (1.2) puede ser implementada de forma numérica, de esta forma, para obtener el valor de A_{out} en sólo un punto se debe integrar sobre todo el plano de entrada. Trabajar de esta manera con la Ecuación (1.2) requiere largos periodos de tiempo (horas o incluso días) para realizar el cálculo completo de A_{out} . Con el fin de minimizar los tiempos de computo, se utilizan diferentes enfoques o aproximaciones que dependen de las condiciones experimentales que deben ser cumplidas [77–79]. Particularmente, las condiciones experimentales de DLHM no permiten que los métodos clásicos como espectro angular [48,79–81] o la transformada de Fresnel [48,81,82] puedan ser utilizados. En DLHM es necesario un método que permita realizar cálculos de difracción para distancias en el orden de mm y que además tenga la capacidad de manipular las dimensiones de la ventana de salida a voluntad. Este último requerimiento es necesario porque generalmente el plano de entrada (holograma) tiene dimensiones en el orden de mm y el plano de salida (muestra) tiene dimensiones en el orden de μm . Diferentes técnicas se han propuesto para la reconstrucción de hologramas registrados en DLHM, como la transformada Fresnel-Bluestein [83] o el método de reconstrucción reportado por Kreuzer [44]. En la literatura especializada se pueden encontrar diversas

implementaciones de estos métodos; resultado de esta tesis de maestría se desarrollaron librerías científicas como JDiffraction [72,84] y plugins gratuitos para el software de procesamiento de imágenes *ImageJ* [85,86], como son *Numerical Propagation* [69,70,87] y *Digital Lensless Holographic Microscopy* [88].

1.2.1 Transformada de Fresnel – Bluestein

La transformada Fresnel – Bluestein es un método derivado de la transformada de Fresnel, la gran ventaja que presenta respecto a la transformada de Fresnel es que elimina la restricción que existe en los tamaños del plano de salida determinados por la distancia de propagación, la longitud de onda y el tamaño del campo de entrada. El término $|\mathbf{r} - \mathbf{r}'| = \left[(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2 + z^2 \right]^{1/2}$ presente en la exponencial y el denominador de la Ecuación (1.2), se puede aproximar utilizando una expansión por series de Taylor hasta el segundo orden. Lo que convierte $|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$ en

$$|\mathbf{r} - \mathbf{r}'| \approx z \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{x - \xi}{z} \right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{y - \eta}{z} \right)^2 \right]. \quad (1.5)$$

Esta nueva expresión se puede introducir en la Ecuación (1.2), bajo ciertas condiciones. En la exponencial, el factor $|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$ está multiplicado por la magnitud del vector de onda, k , que puede tener valores en el orden de 10^7 m^{-1} cuando se trabaja en el rango visible, por esto, un pequeño cambio en $|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$ puede introducir un cambio considerable en la fase. Por este motivo, en la exponencial se deben incluir todos los términos en la Ecuación (1.5). En el denominador, se pueden despreciar todos los términos diferentes de z porque el error introducido es despreciable. Después de introducir la Ecuación (1.5) en la Ecuación (1.2), se obtiene

$$A_{\text{out}}(\mathbf{r}') = \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} e^{i\frac{k}{2z}(\xi^2 + \eta^2)} \iint_{\text{Screen}} \left\{ A_{\text{in}}(\mathbf{r}) \exp \left[i\frac{k}{2z}(x^2 + y^2) \right] \right\} \exp \left[-i\frac{2\pi}{\lambda z}(\xi x + \eta y) \right] d\mathbf{r}, \quad (1.6)$$

que es la transformada de Fresnel. Esta transformada se puede calcular como la transformada de Fourier del término entre llaves dentro de la integral multiplicada por unos términos de fase, esto, teniendo en cuenta que las coordenadas del plano de salida están escaladas a $(\xi/\lambda z, \eta/\lambda z)$. La transformada de Fresnel es válida siempre y cuando se cumpla

$$z^3 \gg \frac{\pi}{4\lambda} \left[(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2 \right]_{\text{máx}}^2, \quad (1.7)$$

esta condición se obtiene requiriendo que el máximo cambio de fase introducido por el tercer orden en la expansión de Taylor sea mucho menor a 1 rad [48].

Para implementar de forma numérica la integral de Fresnel, es necesario que las coordenadas se expresen de manera discreta y por lo tanto la integral como una sumatoria. Las nuevas coordenadas van a estar determinadas por $(x, y) = (m\Delta x, n\Delta y)$ y $(\xi, \eta) = (p\Delta\xi, q\Delta\eta)$, donde m, n, p y q son índices enteros y $\Delta x/\Delta y$ y $\Delta\xi/\Delta\eta$ son los tamaños del paso en los planos de entrada y salida respectivamente. Después de hacer estas sustituciones, la Ecuación (1.6) se convierte en

$$A_{\text{out}}[p, q] = \Delta x \Delta y \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} \exp \left[i \frac{k}{2z} \left[(p\Delta\xi)^2 + (q\Delta\eta)^2 \right] \right] \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} A_{\text{in}}[m, n] \\ \times \exp \left[i \frac{k}{2z} \left[(m\Delta x)^2 + (n\Delta y)^2 \right] \right] \exp \left[-i2\pi \left(\frac{mp}{M} + \frac{nq}{N} \right) \right], \quad (1.8)$$

donde M y N son el número de datos en cada una de las direcciones. La sumatoria en la Ecuación (1.8), se puede convertir en una transformada discreta de Fourier (DFT) requiriendo que $\Delta\xi = \lambda z/M\Delta x$ y $\Delta\eta = \lambda z/N\Delta y$. La Ecuación (1.8) en su forma de Fourier sería entonces

$$A_{\text{out}}[p, q] = \Delta x \Delta y \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} \exp \left[i \frac{k}{2z} \left[(p\Delta\xi)^2 + (q\Delta\eta)^2 \right] \right] \\ \times \text{DFT} \left\{ A_{\text{in}}[m, n] \exp \left[i \frac{k}{2z} \left[(m\Delta x)^2 + (n\Delta y)^2 \right] \right] \right\} \quad (1.9)$$

que por facilidad se puede reescribir como

$$A_{\text{out}}[p, q] = \Delta x \Delta y \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} \exp \left[i \frac{k}{2z} \left[(p\Delta\xi)^2 + (q\Delta\eta)^2 \right] \right] \\ \times \text{DFT} \left\{ A_{\text{in}}[m, n] \exp \left[i \frac{k}{2z} \left[(m\Delta x)^2 + (n\Delta y)^2 \right] \right] \right\}, \quad (1.10)$$

donde la DFT se puede calcular en un tiempo mucho menor usando el algoritmo de transformada rápida de Fourier (FFT) [89]. La principal desventaja de la Ecuación (1.10) es que automáticamente fija el tamaño del paso en el plano de salida y, por lo tanto, el tamaño del plano.

La transformada Fresnel – Bluestein es una forma diferente de calcular la Ecuación (1.9), en esta se realiza una sustitución de los términos $2mp$ y $2nq$ en el núcleo de la DFT para convertirla en una convolución circular [83]. Esta sustitución fue presentada por Bluestein [90] y está dada por $2mp = m^2 + p^2 - (p - m)^2$ y $2nq = n^2 + q^2 - (q - n)^2$, al hacerla en la Ecuación (1.8) y reorganizar algunos términos se obtiene

$$\begin{aligned}
A_{\text{out}}[p, q] = & \Delta x \Delta y \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} \exp \left\{ -i \frac{\pi}{\lambda z} \left[\Delta \xi (\Delta x - \Delta \xi) p^2 + \Delta \eta (\Delta y - \Delta \eta) q^2 \right] \right\} \\
& \times \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} A_{\text{in}}[m, n] \\
& \times \exp \left\{ i \frac{\pi}{\lambda z} \left[\Delta x (\Delta x - \Delta \xi) m^2 + \Delta y (\Delta y - \Delta \eta) n^2 \right] \right\} \\
& \times \exp \left\{ i \frac{\pi}{\lambda z} \left[\Delta x \Delta \xi (p - m)^2 + \Delta y \Delta \eta (q - n)^2 \right] \right\}
\end{aligned} \quad , \quad (1.11)$$

que se conoce como la transformada Fresnel – Bluestein. La sumatoria en la Ecuación (1.11) está en la forma de una convolución discreta y se puede calcular utilizando el teorema de la convolución, es decir,

$$\begin{aligned}
A_{\text{out}}[p, q] = & \Delta x \Delta y \frac{e^{ikz}}{i\lambda z} \exp \left\{ -i \frac{\pi}{\lambda z} \left[\Delta \xi (\Delta x - \Delta \xi) p^2 + \Delta \eta (\Delta y - \Delta \eta) q^2 \right] \right\} \\
& \times \text{DFT}^{-1} \{ F_1 F_2 \}
\end{aligned} \quad , \quad (1.12)$$

donde

$$\begin{aligned}
F_1 = & \text{DFT} \left\{ A_{\text{in}}[m, n] \exp \left\{ i \frac{\pi}{\lambda z} \left[\Delta x (\Delta x - \Delta \xi) m^2 + \Delta y (\Delta y - \Delta \eta) n^2 \right] \right\} \right\} \\
F_2 = & \text{DFT} \left\{ \exp \left[i \frac{\pi}{\lambda z} (m^2 \Delta x \Delta \xi + n^2 \Delta y \Delta \eta) \right] \right\}
\end{aligned} \quad . \quad (1.13)$$

En las Ecuaciones (1.11) y (1.12) es claro que la restricción que antes existía para el tamaño del plano de salida fue eliminada y para reducir el tiempo de computo las DFT en las Ecuaciones (1.12) y (1.13) pueden ser calculadas usando FFT. La transformada Fresnel – Bluestein provee un método efectivo para reconstruir los hologramas capturados en una arquitectura de DLHM, para hacer esto, $A_{\text{in}}[m, n]$ debe ser remplazado por el holograma registrado multiplicado punto a punto por una onda compleja de iluminación similar a la onda esférica utilizada para registrar el holograma. Definir las características de la onda de referencia utilizada en el registro es prácticamente imposible, por lo cual, en general se usa una onda esférica y se tienen en cuenta los criterios necesarios de muestreo para la fase de esta onda [48].

1.2.2 Patente Universidad Nacional de Colombia

Dentro de la patente registrada por Garcia-Sucerquia et al. a nombre de la Universidad Nacional de Colombia en el año 2014 [47] se incluye una técnica de reconstrucción para hologramas que tiene en cuenta las exigentes condiciones experimentales de DLHM. Esta técnica permite cambiar los tamaños de la ventana de salida como la transformada Fresnel – Bluestein y, además, tiene en cuenta la iluminación esférica utilizada para registrar el holograma.

La reconstrucción del holograma registrado se realiza utilizando una versión modificada de la integral de Fresnel – Kirchhoff presentada en la Ecuación (1.2), en este caso el campo de entrada $A_{in}(\mathbf{r})$ va a estar dado por

$$A_{in}(\mathbf{r}) = \tilde{H}(\mathbf{r})R^*(\mathbf{r}),$$

donde $\tilde{H}(\mathbf{r})$ se conoce como holograma de contraste y $R^*(\mathbf{r})$ es la onda de referencia conjugada. El holograma de contraste se puede obtener siguiendo el procedimiento presentado en la subsección 1.2.3. Después de sustituir $A_{in}(\mathbf{r})$ en la integral de Fresnel – Kirchhoff se obtiene

$$A_{out}(\mathbf{r}') = -\frac{i}{2\lambda_{Sensor}} \iint \tilde{H}(\mathbf{r})R^*(\mathbf{r}) \frac{\exp[ik|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|]}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} (1 + \cos \chi) d\mathbf{r}, \quad (1.14)$$

donde $\mathbf{r} = (x, y, L)$, $\mathbf{r}' = (\xi, \eta, z)$ y L/z representan la distancia que existe entre la fuente puntual y la cámara/muestra respectivamente.

A diferencia de la patente registrada por Kreuzer en 2002 [44], en esta patente el vector diferencia se escribe sin aproximarse como

$$|\mathbf{r}-\mathbf{r}'| = r \sqrt{1 - \frac{2(\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}') - r'^2}{r^2}}$$

y usando una expansión por series de Taylor hasta el primer orden se puede escribir como

$$|\mathbf{r}-\mathbf{r}'| \approx r \left[1 - \frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}' - (r'^2/2)}{r^2} \right]. \quad (1.15)$$

De manera similar que en el proceso para llegar a la transformada de Fresnel, en este caso se usa la Ecuación (1.15) para la fase y $|\mathbf{r}-\mathbf{r}'| \approx r$ para el denominador. Cuando se introducen estos cambios en la Ecuación (1.14), se obtiene

$$A_{\text{out}}(\mathbf{r}') = -\frac{i}{2\lambda} \iint_{\text{Sensor}} \tilde{H}(\mathbf{r}) R^*(\mathbf{r}) \exp\left\{ ik \left[r - \frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}' - (r'^2/2)}{r} \right] \right\} \left(\frac{1}{r} \right) (1 + \cos \chi) d\mathbf{r} . \quad (1.16)$$

Por último, se reemplaza la forma explícita de la onda de referencia conjugada

$$R^*(\mathbf{r}) = A_R \frac{\exp[-ikr]}{r}$$

y se obtiene que el campo reconstruido es

$$A_{\text{out}}(\mathbf{r}') = -\frac{iA_R}{2\lambda} \iint_{\text{Sensor}} \tilde{H}(\mathbf{r}) \exp\left[-ik \frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}' - (r'^2/2)}{r} \right] \left(\frac{1}{r^2} \right) (1 + \cos \chi) d\mathbf{r} . \quad (1.17)$$

Para realizar la implementación numérica de la integral en la Ecuación (1.17) se propone realizar previamente un cambio de coordenadas, esto con el fin de eliminar la no linealidad del factor de fase presente. Cualquier transformación que permita eliminar la no linealidad es permitida. En la patente se sugiere el uso de una transformación que relaciona las coordenadas cartesianas originales, (x, y) , con un nuevo par, (X, Y) , utilizando la distancia fuente – cámara y la magnitud del vector de posición en el plano de registro medido desde la fuente puntual. La transformación está dada por

$$\begin{aligned} x &= XL/R \\ y &= YL/R \\ R &= (L^2 - X^2 - Y^2)^{1/2} \end{aligned} , \quad (1.18)$$

su transformación inversa por

$$\begin{aligned} X &= xL/r \\ Y &= yL/r \\ r &= (L^2 + x^2 + y^2)^{1/2} \end{aligned} \quad (1.19)$$

y su Jacobiano por

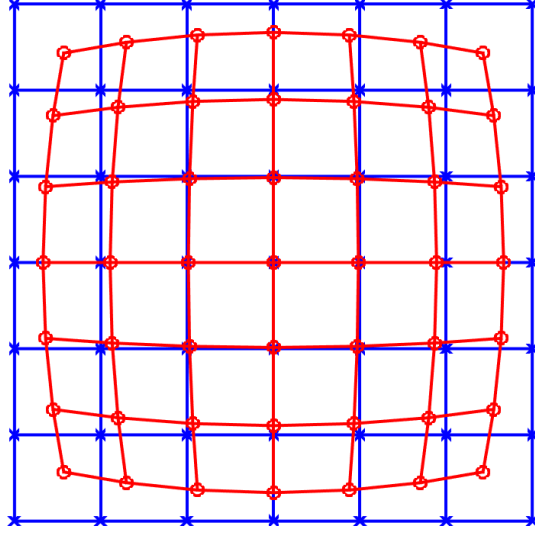
$$\frac{\partial(x, y)}{\partial(X, Y)} = \left(\frac{L}{R} \right)^4 .$$

En la Figura 1-3 se muestra de manera gráfica la relación entre las mallas de los sistemas coordenados antes y después de realizar la transformación de coordenadas propuesta en la Ecuación (1.18).

Sustituyendo este nuevo sistema de coordenadas en la Ecuación (1.17), se obtiene

$$A_{\text{out}}(\mathbf{r}') = \iint_{\text{Sensor}} \tilde{H}'(X, Y) \exp\left[-ik \frac{X\xi + Y\eta}{L} \right] dXdY \quad (1.20)$$

Figura 1-3: Mallas coordenadas antes (azul) y después (rojo) de realizar el cambio de coordenadas.



con

$$\tilde{H}'(X,Y) = -\frac{iA_R}{2\lambda} \tilde{H}(x(X,Y), y(X,Y)) \exp\left[-\frac{ikR}{L}\left(z - \frac{r'^2}{2}\right)\right] \left(\frac{1}{R^2}\right) \left(1 + \frac{R}{L}\right). \quad (1.21)$$

Después de realizar esta transformación, el siguiente paso es discretizar la expresión de la Ecuación (1.20), esto se puede hacer expresando las coordenadas (X,Y) y (ξ,η) de manera discreta, lo cual convierte la integral en una doble sumatoria. Las nuevas coordenadas van a estar determinadas por $(X,Y) = (m\Delta X, n\Delta Y)$ y $(\xi,\eta) = (p\Delta\xi, q\Delta\eta)$, donde m, n, p y q son índices enteros y $\Delta X/\Delta Y$ y $\Delta\xi/\Delta\eta$ son los tamaños del paso en los planos de registro y reconstrucción, respectivamente. Los tamaños de pixel en el plano de registro transformado están dados por

$$\Delta X = \frac{1}{M} \left[\frac{x_{\max} L}{(L^2 + x_{\max}^2)^{1/2}} - \frac{x_{\min} L}{(L^2 + x_{\min}^2)^{1/2}} \right] y$$

$$\Delta Y = \frac{1}{N} \left[\frac{y_{\max} L}{(L^2 + y_{\max}^2)^{1/2}} - \frac{y_{\min} L}{(L^2 + y_{\min}^2)^{1/2}} \right].$$

Después de hacer el cambio a coordenadas discretas, la Ecuación (1.20) se convierte en

$$A_{\text{out}}[p,q] = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} \tilde{H}'[m,n] \exp\left[-\frac{i2\pi}{\lambda L}(m\Delta X p \Delta\xi + n\Delta Y q \Delta\eta)\right] \Delta X \Delta Y. \quad (1.22)$$

Si se hacen $\Delta\xi = \lambda L/M\Delta X$ y $\Delta\eta = \lambda L/N\Delta Y$, se puede calcular la Ecuación (1.22) como una DFT

$$A_{\text{out}}[p, q] = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} \tilde{H}'[m, n] \exp\left[-i2\pi\left(\frac{mp}{M} + \frac{nq}{N}\right)\right] \Delta X \Delta Y,$$

que por facilidad se puede escribir como

$$A_{\text{out}}[p, q] = \Delta X \Delta Y \times \text{DFT}\{\tilde{H}'[m, n]\}. \quad (1.23)$$

Al igual que en la transformada de Fresnel, la mayor desventaja de esta metodología es que impone un tamaño fijo para el paso en el plano de reconstrucción. Esta limitación puede ser removida si nuevamente se hace la sustitución propuesta por Bluestein [90] en la Ecuación (1.22). Después de realizar la sustitución dada por $2mp = m^2 + p^2 - (p-m)^2$ y $2nq = n^2 + q^2 - (q-n)^2$, se obtiene

$$\begin{aligned} A_{\text{out}}[p, q] &= \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda L}(p^2\Delta X\Delta\xi + q^2\Delta Y\Delta\eta)\right] \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} \tilde{H}'[m, n] \\ &\quad \times \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda L}(m^2\Delta X\Delta\xi + n^2\Delta Y\Delta\eta)\right] \\ &\quad \times \exp\left\{\frac{i\pi}{\lambda L}\left[\Delta X\Delta\xi(p-m)^2 + \Delta Y\Delta\eta(q-n)^2\right]\right\} \Delta X \Delta Y \end{aligned} \quad (1.24)$$

La Ecuación (1.24) tiene la forma de una convolución circular y puede ser calculada como

$$A_{\text{out}}[p, q] = \Delta X \Delta Y \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda L}(p^2\Delta X\Delta\xi + q^2\Delta Y\Delta\eta)\right] \text{DFT}^{-1}\{F_1 F_2\}, \quad (1.25)$$

donde

$$\begin{aligned} F_1 &= \text{DFT}\left\{\tilde{H}'[m, n] \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda L}(m^2\Delta X\Delta\xi + n^2\Delta Y\Delta\eta)\right]\right\} \\ F_2 &= \text{DFT}\left\{\exp\left[\frac{i\pi}{\lambda L}(m^2\Delta X\Delta\xi + n^2\Delta Y\Delta\eta)\right]\right\} \end{aligned} \quad (1.26)$$

De esta forma la restricción que existía para los tamaños de pixel en el plano de reconstrucción desaparece y se puede elegir a voluntad. Nuevamente, las DFT pueden ser calculadas utilizando FFT para reducir el tiempo de cómputo.

1.2.3 Preparación del holograma

La preparación del holograma es un procedimiento previo al cálculo de la Ecuación (1.25), en este se incluye la generación del holograma de contraste y la interpolación del holograma a la nueva malla dada por la transformación presentada en la Ecuación (1.18).

Bajo condiciones ideales en DLHM, la onda de referencia generada cuando la luz es emitida desde el pinhole es esférica, pero en una situación experimental, esta onda de referencia puede ser afectada por diferentes factores. Para solucionar esto y además reducir la influencia del orden cero, se sugiere remover tanto como sea posible la onda de referencia presente en el holograma [43,45,91]. En la literatura se han sugerido dos métodos para eliminar la onda de referencia. Ambas metodologías requieren que se capturen dos registros de intensidad utilizando el sensor digital, el primero de ellos es el holograma, es decir, un registro de intensidad con la muestra presente, ver Figura 1-4 (a); el segundo, es un registro sin la muestra y representa la intensidad de la onda de referencia, ver Figura 1-4 (b).

Después de capturar estas imágenes, el paso siguiente es procesarlas digitalmente con el fin de obtener un holograma en el cual se han removido los factores asociados a la onda de referencia tanto como sea posible. La primera técnica sugiere que se realice una resta punto a punto del holograma registrado y la intensidad de la onda de referencia [43,45], matemáticamente esto sería

$$\tilde{H}(\mathbf{r}) = H(\mathbf{r}) - R^2(\mathbf{r}). \quad (1.27)$$

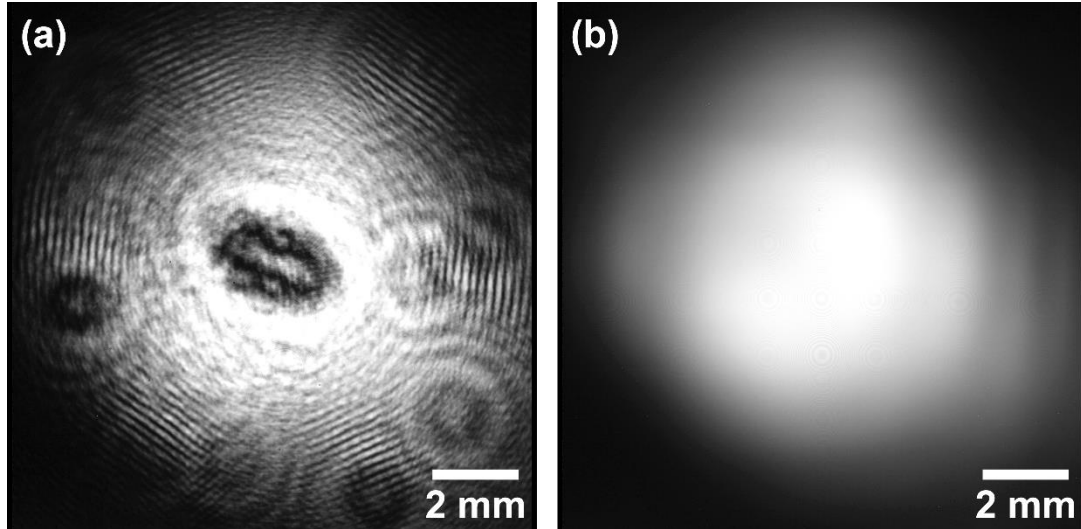
Si en esta expresión, se reemplaza $H(\mathbf{r})$ usando la Ecuación (1.1), se obtiene

$$\tilde{H}(\mathbf{r}) = [R^*(\mathbf{r})O(\mathbf{r}) + R(\mathbf{r})O^*(\mathbf{r})] + O^2(\mathbf{r}),$$

donde claramente el factor $R^2(\mathbf{r})$ ha desaparecido del holograma. El término en corchetes generalmente se le llama patrón de difracción holográfico y domina la imagen obtenida para $\tilde{H}(\mathbf{r})$ siempre y cuando el objeto presente en la muestra sea pequeño, es decir, que bloquee sólo una porción del cono de luz y que además produzca poco esparcimiento de la onda que incide en él. El segundo término en la ecuación se conoce como el patrón de difracción clásico del objeto, cuando el objeto es muy grande este término es dominante y la recuperación de la información codificada en el holograma se hace más compleja.

La segunda técnica para obtener el holograma de contraste, además de realizar una resta punto a punto del holograma y la intensidad de la onda de referencia, hace una división por la amplitud de la onda de referencia [91]. Escribiendo esto matemáticamente, se tiene

Figura 1-4: Holograma y referencia capturados para unas esferas de poliestireno de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro. (a) Intensidad registrada con la muestra presente (holograma). (b) Intensidad registrada sin muestra (referencia).

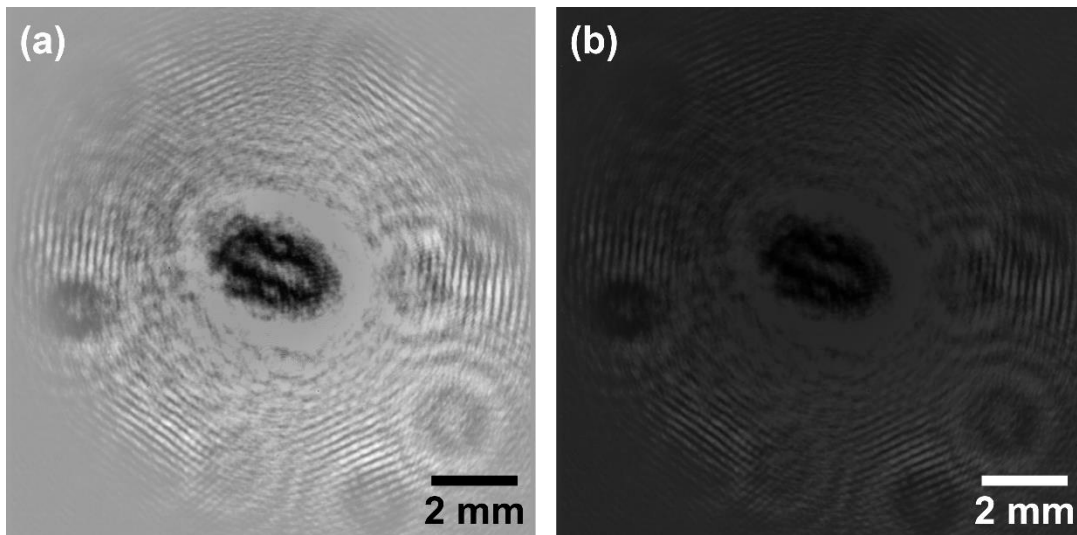


$$\tilde{H}(\mathbf{r}) = \frac{H(\mathbf{r}) - R^2(\mathbf{r})}{|R(\mathbf{r})|}, \quad (1.28)$$

donde $|R(\mathbf{r})|$ se obtiene tomando la raíz cuadrada de la intensidad registrada para la onda de referencia.

Si se está utilizando la patente registrada por Garcia-Sucerquia et al. [47] como método de reconstrucción, después de remover la referencia presente en el holograma, el paso a seguir es realizar la interpolación del holograma de contraste a una nueva malla. La introducción de un cambio de coordenadas requiere que el holograma sea introducido en la transformada como función de las nuevas coordenadas (X, Y) . Estas nuevas coordenadas no son uniformes y están representadas en una malla con puntos que no son equidistantes y que tiene forma de barril, ver Figura 1-3. Con el fin de hacer uso de transformadas de Fourier uniformes en la reconstrucción, una malla uniforme y con puntos equidistantes se debe superponer a la malla no uniforme, además se deben determinar los nuevos valores de intensidad para la malla uniforme a partir de los valores de la malla con

Figura 1-5: Hologramas de contraste. (a) Calculado usando la Ecuación (1.27). (b) Calculado usando la Ecuación (1.28).



forma de barril. Los nuevos valores pueden ser determinados utilizando un método de interpolación adecuado, por ejemplo, interpolación por el vecino más cercano. En la Figura 1-6 se muestran los hologramas de la Figura 1-5 después de realizar una interpolación del vecino más cercano, también se muestran algunos puntos de las mallas uniforme (verde) y no uniforme (roja) para estos hologramas.

Figura 1-6: Hologramas interpolados, se muestran la malla uniforme (verde) y la malla con forma de barril (rojo) superpuestas en los hologramas. (a) Holograma de la Figura 1-5 (a) interpolado. Holograma de la Figura 1-5 (b) interpolado.

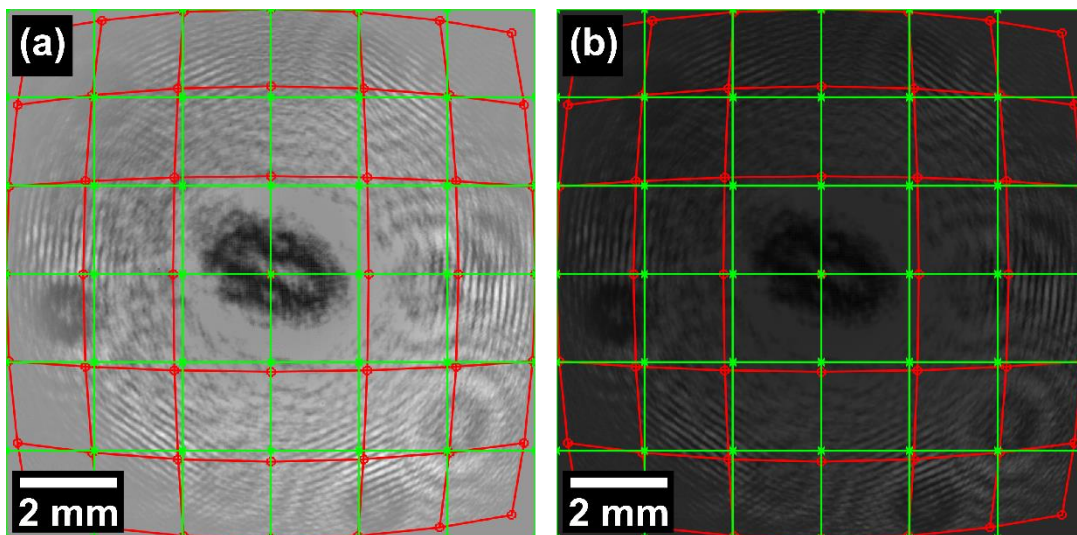
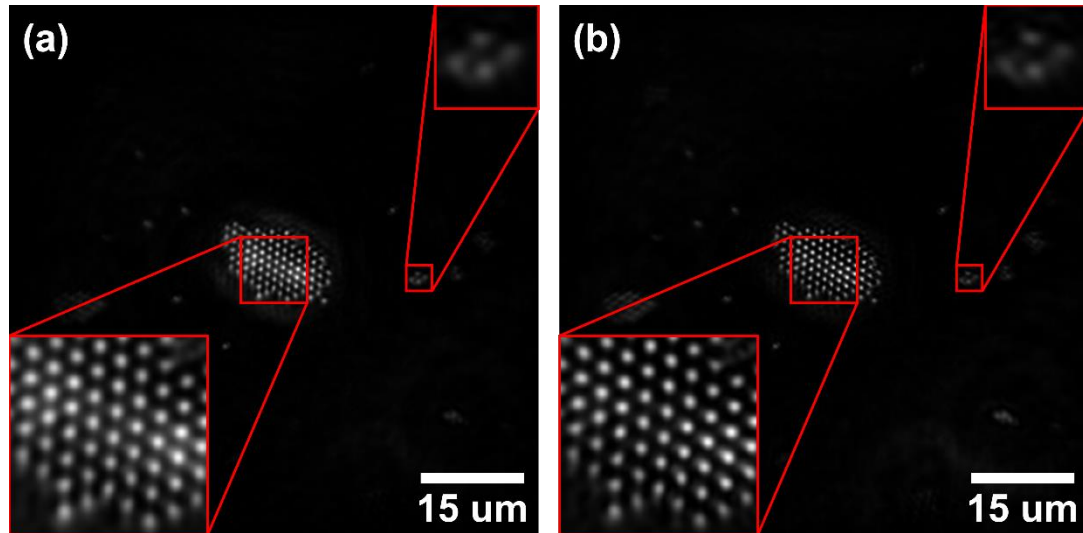


Figura 1-7: Reconstrucción de los hologramas interpolados en la Figura 1-6 usando el plugin *Digital Lensless Holographic Microscopy* [88].



En la Figura 1-7 se presentan las reconstrucciones obtenidas usando los hologramas interpolados en la Figura 1-6 y el plugin *Digital Lensless Holographic Microscopy* [88] para *ImageJ*, este plugin implementa el método de reconstrucción presentado en la patente registrada por Garcia-Sucerquia et al. [47] y definido por la Ecuación (1.25). En las imágenes se puede observar la reconstrucción de las esferas de poliestireno. Normalmente las imágenes obtenidas en un microscopio compuesto convencional presentan los objetos en un fondo iluminado, pero en las reconstrucciones de la Figura 1-7 se pueden observar las esferas brillantes sobre un fondo oscuro, de alguna manera asemejándose a las imágenes obtenidas en microscopía de campo oscuro. El fondo brillante se remueve debido al uso del holograma de contraste en el cual se elimina la referencia tanto como sea posible antes de la reconstrucción. En la reconstrucción de la Figura 1-7 (b) se pueden observar las esferas con mayor definición, pero esto no implica que estén mejor enfocadas, simplemente significa que la onda de referencia (fondo brillante) se removió de la mejor manera posible.

1.3. Apertura numérica y resolución

En microscopía la resolución del sistema es un factor de gran importancia, ésta determina cual es la distancia mínima que puede existir entre dos detalles de la muestra para que el sistema sea capaz de reconstruirlos como dos objetos separados y no como uno solo. En

la referencia [45] Garcia-Sucerquia et al. presentan un estudio detallado de los diferentes factores que pueden modificar la resolución del sistema, entre estos factores se encuentran: (i) tamaño del pinhole; (ii) apertura numérica, definida por el tamaño y la ubicación del sensor digital; (iii) distribución y tamaño de los píxeles en el sensor digital; y (iv) la longitud de onda de la iluminación.

La distribución y tamaño de los píxeles presentes en el sensor digital determinan el correcto muestreo de las franjas presentes en el patrón de interferencia. Cuando estas franjas se muestrean correctamente, es decir, siguiendo el teorema del muestreo de Nyquist-Shannon [48], la información codificada en el holograma puede ser recuperada en su totalidad. En el caso contrario, si el muestreo no se realiza correctamente la reconstrucción se verá afectada y el sistema no será capaz de resolver algunos detalles [45,92].

El análisis realizado en [45] contempla una onda esférica que ilumina dos objetos puntuales ubicados en el plano de la muestra en posiciones dadas por los vectores r_1 y r_2 , a partir de los cuales emergen dos nuevas ondas esféricas. Si además se requiere que los objetos estén ubicados de manera simétrica respecto al eje óptico y en un plano paralelo al sensor digital, entonces se puede decir que $|r_1| = |r_2|$. De esta situación se puede determinar que la resolución lateral en un sistema de DLHM está dada por

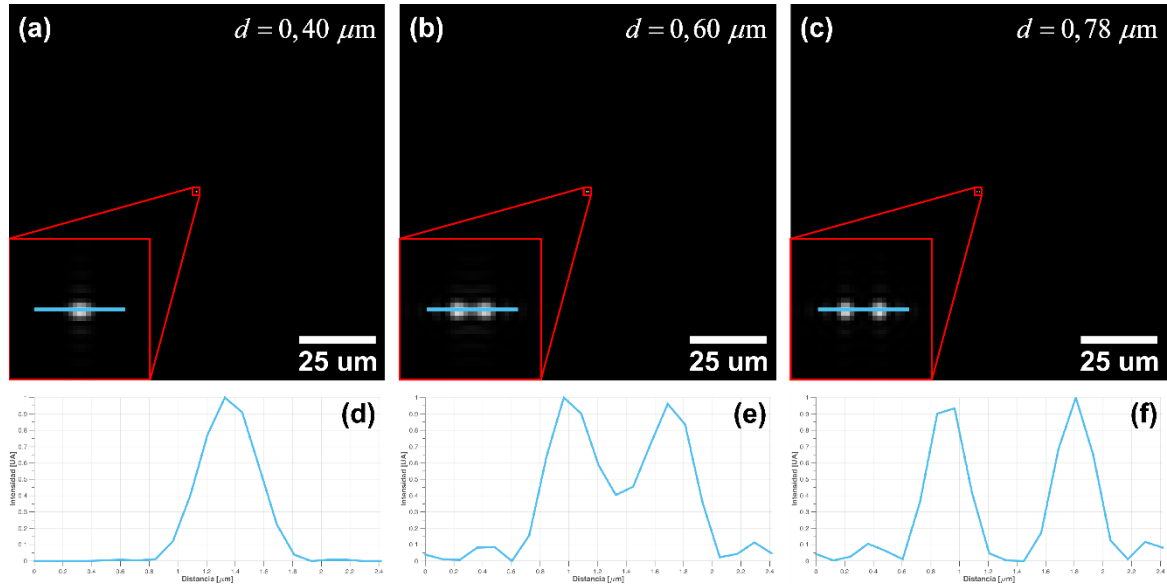
$$|r_2 - r_1| \geq \frac{\lambda}{2NA}, \quad (1.29)$$

donde λ es la longitud de onda de la iluminación y NA es la apertura numérica del sistema de registro, dada por

$$AN = \sin \theta_m = \frac{(W/2)}{\left[(W/2)^2 + L^2 \right]^{1/2}},$$

donde W es el ancho del sensor digital y L la distancia entre la fuente puntual y el sensor digital. La apertura numérica siempre tiene valores en el intervalo $[0,1]$ y es adimensional. Por ejemplo, si se quiere tener una resolución lateral teórica de $1 \mu\text{m}$ utilizando iluminación en el rango visible ($\lambda \sim 500 \text{ nm}$), se debe trabajar con una apertura numérica mayor o igual a 0,25. En la práctica, la resolución lateral del sistema es menor que el valor indicado por la Ecuación (1.29); por lo cual, para el ejemplo anterior se necesitaría una apertura numérica mayor que 0,25 para obtener una resolución lateral de $1 \mu\text{m}$. Para ilustrar este

Figura 1-8: Reconstrucciones en intensidad para hologramas simulados con dos objetos puntuales. (a), (b) y (c) reconstrucciones en intensidad. (d), (e) y (f) perfiles de intensidad tomados a lo largo de las líneas azules en los cuadros (a), (b) y (c), respectivamente.



problema, se simularon hologramas usando una longitud de onda $\lambda = 405 \text{ nm}$ y $\text{AN} = 0,52$; parámetros con los que se obtiene una resolución lateral teórica igual a $0,39 \mu\text{m}$. Teniendo en cuenta el valor teórico de la resolución lateral, se tomó como muestra dos objetos puntuales separados una distancia d conocida con valores $d = 0,40 \mu\text{m}$, $d = 0,60 \mu\text{m}$ y $d = 0,78 \mu\text{m}$. En la Figura 1-8 se muestran los resultados obtenidos después de reconstruir los hologramas en intensidad. En el cuadro (a) sólo se puede distinguir la presencia de un objeto puntual, por lo cual se puede afirmar que la resolución lateral del sistema es menor al valor indicado por la Ecuación (1.29). Por el contrario, en los cuadros (b) y (c) se puede apreciar una caída de intensidad lo cual facilita la distinción de dos objetos puntuales diferentes. Estas afirmaciones toman aún más fuerza cuando se miran los perfiles de intensidad en los cuadros (d), (e) y (f) correspondientes a las líneas azules en los cuadros (a), (b) y (c).

El tamaño del pinhole determina el cono de iluminación, fijando la apertura numérica de la misma; idealmente, el cono de luz debe cubrir toda el área del medio de registro digital. Por esto, se requiere que la AN de la iluminación esté en concordancia con la AN del sistema de registro. La apertura numérica efectiva del sistema está determinada por el

menor valor entre las aperturas numéricas de la iluminación y del sistema de registro, por esto, no tiene sentido trabajar con un medio de registro de grandes dimensiones (alta AN) si la AN de la iluminación no es suficiente para cubrir toda el área de registro o viceversa.

Siguiendo un procedimiento similar al anterior, en [45] se deriva una expresión para la resolución axial del sistema y se dice que dos puntos pueden resolverse axialmente por el sistema si se cumple que

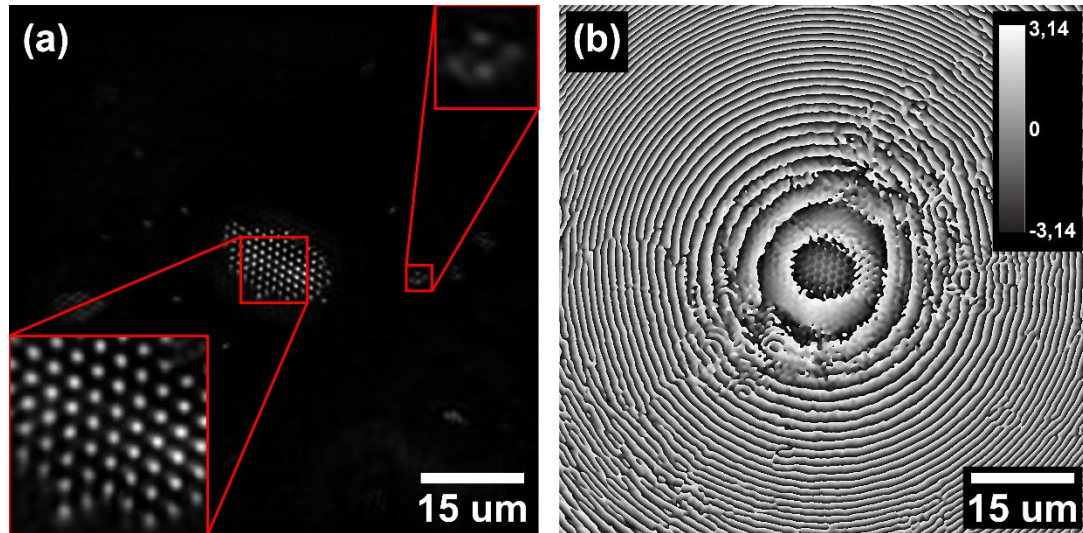
$$|r_2 - r_1| \geq \frac{\lambda}{2(\text{NA})^2}, \quad (1.30)$$

de esta expresión es claro que obtener alta resolución axial es una labor más difícil debido a que la apertura numérica aparece al cuadrado en el denominador. Por ejemplo, trabajando con iluminación en el rango visible ($\lambda \sim 500 \text{ nm}$) y $\text{NA} \sim 0.25$, teóricamente, la mínima distancia que puede existir entre dos objetos para ser resueltos por el sistema es de $4 \mu\text{m}$.

1.4. Medidas cuantitativas de fase

La característica más atractiva de los sistemas holográficos y en particular de los microscopios holográficos, incluyendo DLHM, es que permiten recuperar las medidas de fase de la muestra [65,93,94]. Como se mencionó anteriormente, en DLHM se pueden obtener medidas de fase, usando la Ecuación (1.4), a partir del campo reconstruido. Cuando estas medidas de fase se obtienen usando el holograma de contraste para la reconstrucción, no representan mapas de fase adecuados y que correspondan a la muestra; esto debido a que la fase del objeto se encuentra codificada en los cambios de intensidad registrados en el holograma original y cuando se obtiene el holograma de contraste estos cambios de intensidad inevitablemente son modificados. En la Figura 1-9 se muestran las reconstrucciones en intensidad y fase para el holograma de contraste presentado en la Figura 1-5 (b), nuevamente se utilizó el plugin *Digital Lensless Holographic Microscopy* [88]. En la reconstrucción en intensidad se pueden distinguir claramente las esferas que están en el centro de la imagen y desplazadas lateralmente hacia la derecha. En la reconstrucción en fase se debería poder observar una distribución similar, sin embargo, lo que se obtiene es un mapa de fase perturbado por factores aparentemente esféricos y en el cual no se pueden distinguir las esferas.

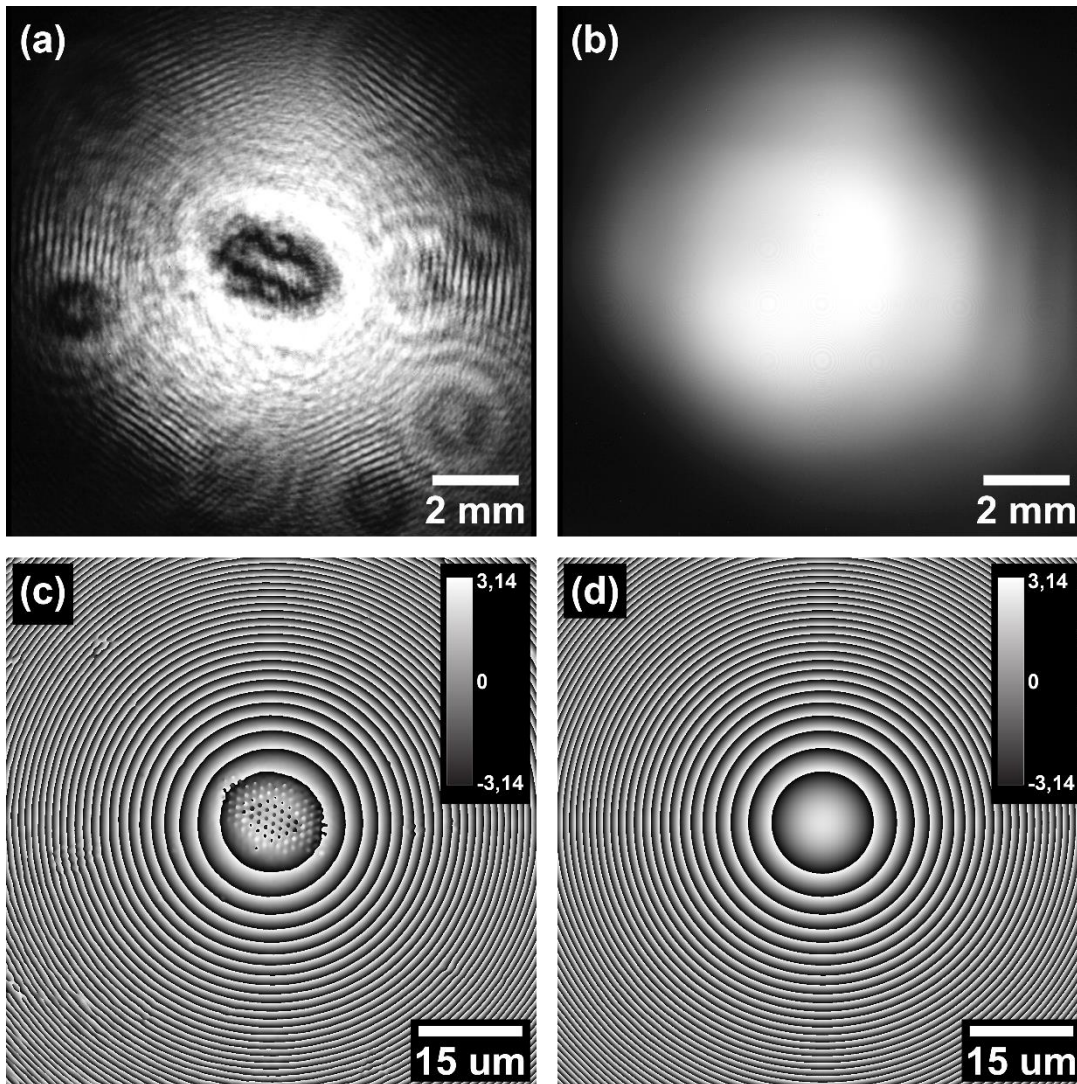
Figura 1-9: Reconstrucción en intensidad y fase de las esferas de poliestireno registradas en el holograma de la Figura 1-4 (a). (a) Intensidad. (b) Fase.



Con el fin de solucionar este problema, Jericho et al. [65] proponen una metodología simple y que permite compensar las perturbaciones que aparecen en los mapas de fase. El método se puede describir en los siguientes pasos:

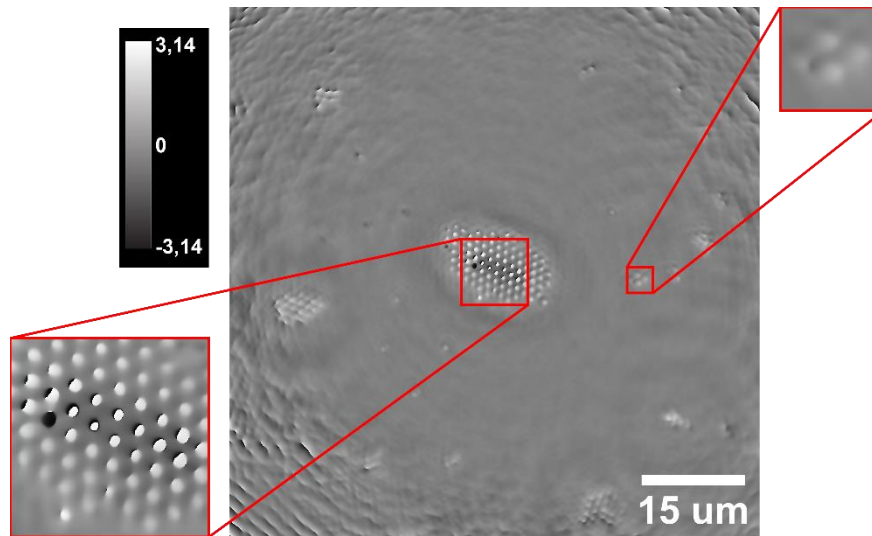
- (a) Reconstruir el holograma sencillo (registrado directamente en el sensor), ver Figura 1-10 (a), y obtener el campo complejo $\psi_o(\mathbf{r}')$.
- (b) Calcular la fase del campo reconstruido $\psi_o(\mathbf{r}')$, y obtener la distribución de fase $\phi_o(\mathbf{r}')$, ver Figura 1-10 (c).
- (c) Reconstruir la intensidad de la onda de referencia, ver Figura 1-10 (b), y obtener el campo complejo $\psi_R(\mathbf{r}')$.
- (d) Calcular la fase del campo reconstruido $\psi_R(\mathbf{r}')$, y obtener la distribución de fase $\phi_R(\mathbf{r}')$, ver Figura 1-10 (d).
- (e) Realizar una resta punto a punto de las funciones $\phi_o(\mathbf{r}')$ y $\phi_R(\mathbf{r}')$.
- (f) El resultado de la resta puntual debe llevarse a módulo 2π , esto es, en los puntos que el resultado sea menor que $-\pi$ debe sumársele 2π y en los puntos donde sea mayor a π debe restársele 2π . El resultado obtenido de esta resta representa el mapa de fase con las perturbaciones compensadas.

Figura 1-10: (a) Holograma sencillo. (b) Intensidad de la onda de referencia (sin muestra). (c) Reconstrucción en fase para (a), representa $\phi_o(r')$. (d) Reconstrucción en fase para (b), representa $\phi_R(r')$.



El resultado de este procedimiento para el holograma presentado en la Figura 1-10 (a), se muestra en la Figura 1-11. En la imagen se pueden distinguir claramente las esferas centrales y las que se encuentran desplazadas lateralmente, además, las perturbaciones que aparecían en la Figura 1-9 (b) ahora no están presentes. Idealmente el fondo en este mapa de fase debería ser constante, es decir, verse plano, pero en la imagen es claro que esto no sucede. El ruido aún presente en la fase se debe al otro orden de difracción presente en el holograma, generalmente antes de reconstruir se elige si se desea reconstruir el orden +1 o -1 de difracción. Por ejemplo, si se reconstruye el orden +1, la

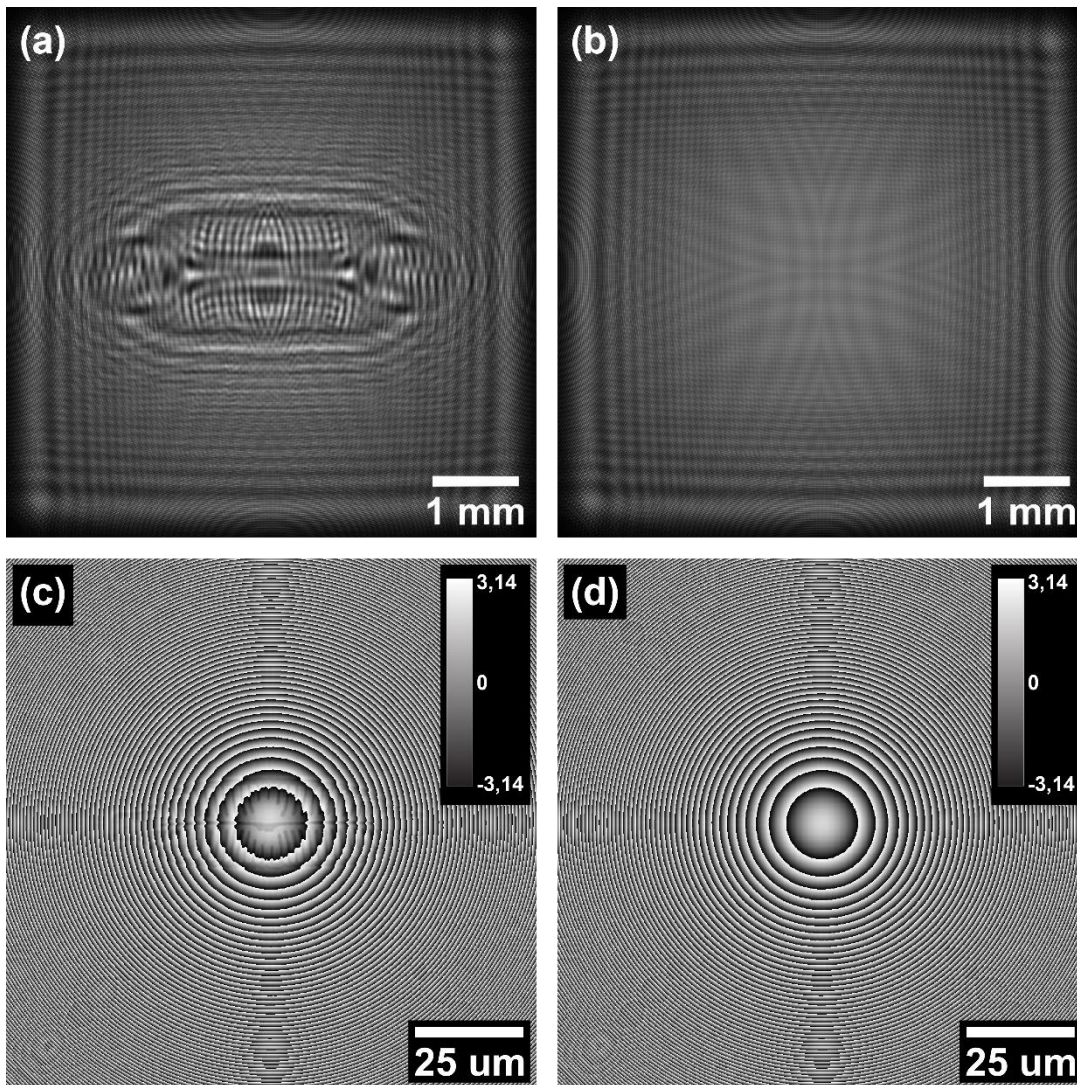
Figura 1-11: Mapa de fase obtenido para el holograma en la Figura 1-10 (a) después de realizar la resta de fases con módulo 2π .



información del orden -1 va a estar presente en el campo reconstruido, pero desenfocada, esta información desenfocada se denomina imagen gemela. Generalmente la influencia de la imagen gemela puede ser despreciada cuando se trabaja en intensidad y con objetos que no sean estructuralmente complejos. En la Figura 1-11 es claro que la presencia de la imagen gemela puede afectar las medidas de fase y esto puede llevar a diagnósticos y mediciones erradas.

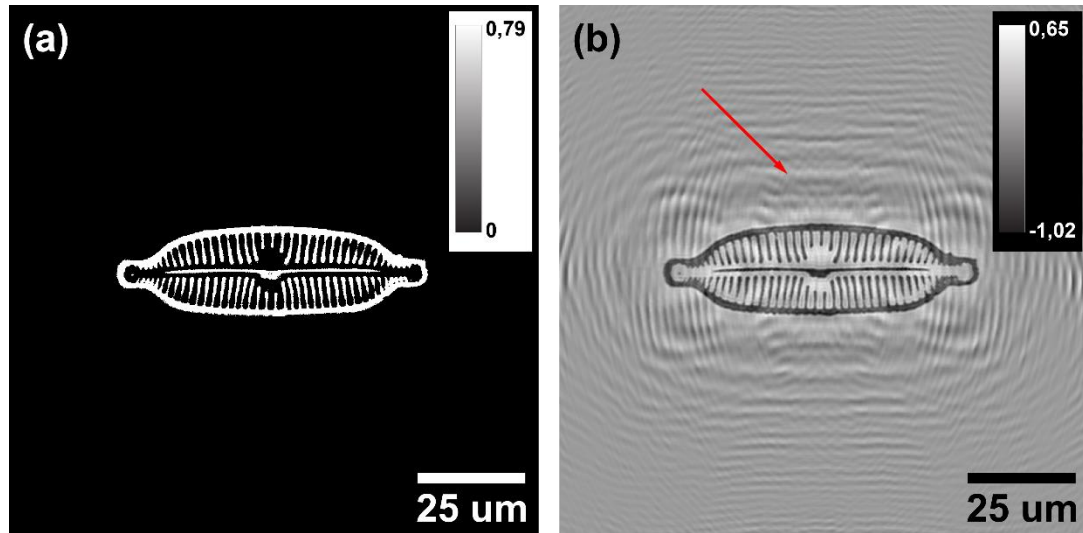
Para ilustrar con mayor detalle el problema de la imagen gemela, se puede simular un holograma típico de DLHM utilizando como muestra un objeto con una estructura más compleja. La simulación se puede realizar siguiendo la receta presentada en [95]. Esta receta es implementada en el plugin *Digital Lensless Holographic Microscopy* para *ImageJ* [88] que provee una interfaz intuitiva y amigable para el usuario. Para construir la muestra se asume que es un objeto de fase, es decir, tiene amplitud igual a 1 en todos los puntos y una distribución de fase conocida, $\varphi_o(\mathbf{r}')$. Así, se puede construir una amplitud compleja para el objeto, $O(\mathbf{r}') = \exp[i\varphi_o(\mathbf{r}')$, que puede ser multiplicada punto a punto por la iluminación y posteriormente ser propagada al plano de registro usando un método numérico de difracción adecuado [95]. En la Figura 1-12 se presentan el holograma simulado, la referencia simulada y las reconstrucciones en fase obtenidas para ambas imágenes.

Figura 1-12: Simulación del proceso de registro para una distribución de fase conocida. (a) Holograma sencillo. (b) Intensidad de la onda de referencia (sin muestra). (c) Reconstrucción en fase para (a), representa $\phi_o(r')$. (d) Reconstrucción en fase para (b), representa $\phi_R(r')$.



En la Figura 1-13 se muestran dos distribuciones de fase, en el cuadro (a) se presenta la fase introducida en la simulación, donde las zonas oscuras representan 0 rad y las zonas brillantes $\pi/4 \text{ rad}$. En el cuadro (b) se muestra la distribución de fase obtenida realizando la resta módulo 2π con las fases recuperadas a partir del holograma simulado y su referencia, esta distribución tiene una forma similar a la que se introdujo en la simulación, pero los valores de fase no corresponden, en gran medida esta diferencia en los valores

Figura 1-13: (a) Distribución de fase introducida en la simulación. (b) Distribución de fase recuperada usando el procedimiento previamente descrito.



de fase se debe a la presencia de la imagen gemela, señalada con la flecha roja. Con esta simulación se demuestra que el método previamente descrito puede funcionar y entregar medidas de fase confiables, pero sólo bajo ciertas condiciones, como que el objeto estructuralmente sea sencillo y que produzca bajo esparcimiento con el fin de reducir la influencia de la imagen gemela.

En la literatura se han presentado diversos métodos para eliminar la influencia de la imagen gemela en las reconstrucciones, por ejemplo se puede trabajar con geometrías y sistemas denominados fuera de eje [51,96], en los cuales la onda de referencia y la onda objeto inciden en el detector con un ángulo entre sus vectores de onda. La existencia de este ángulo, permite realizar un procedimiento de filtrado espacial con el fin de eliminar el orden cero y la imagen gemela [52,71]. Para sistemas en línea en los que la onda de referencia y la onda objeto viajan por dos brazos diferentes, también se ha propuesto utilizar las técnicas de corrimiento de fase [53,54], el principal problema es que estas técnicas requieren múltiples registros de intensidad, dificultando el estudio en vivo de muestras. Por último en los sistemas en línea, en los que la onda de referencia y la onda objeto viajan por el mismo camino hasta llegar al sensor digital, como en DLHM, la solución para eliminar la imagen gemela ha sido usar los métodos iterativos en los cuales se realizan propagaciones sucesivas entre los planos de registro y reconstrucción, imponiendo condiciones en cada uno, hasta eliminar la imagen gemela [56,60–64]. Hasta ahora, en su

gran mayoría las metodologías iterativas se han trabajado en condiciones de aperturas numéricas como máximo de 0,1 [62–64] que no implican los retos que conllevan los sistemas DLHM prácticos, permitiendo el uso de técnicas de propagación como espectro angular [79,80] en la que no se realiza ninguna aproximación. Adicional a estos reportes, existe una técnica que a partir del uso de técnicas iterativas y múltiples registros de intensidad con diferentes longitudes de onda para la iluminación, permite recuperar mapas de fase en sistemas con AN del orden de 0,83 [68], la cual se proyectaría como la técnica ideal para DLHM. Sin embargo, no ha sido posible reproducir los resultados reportados para esta técnica, a pesar de haber contactado a los autores del trabajo con el fin de obtener el código fuente de la implementación numérica. Los buenos resultados obtenidos con los métodos iterativos los hacen una opción atractiva que merecen ser implementados bajo las complejas condiciones de DLHM para mejorar los resultados de fase obtenidos en esta técnica de microscopía.

2. Métodos de recuperación de fase a partir de medidas de intensidad (RFMI)

Los algoritmos iterativos de recuperación de fase se presentan como una posibilidad para obtener medidas cuantitativas de fase a partir del procesamiento digital de los registros de intensidad típicos en DLHM. Estos algoritmos se desarrollaron con base en el trabajo de Gerchberg y Saxton el cual permite obtener medidas cuantitativas de fase a partir de dos registros de intensidad y el cómputo sucesivo de transformadas de Fourier entre dos planos [56,57]. Posteriormente se desarrollaron variantes de esta metodología que permiten obtener las medidas cuantitativas de fase a partir de un único registro de intensidad, pero imponiendo condiciones para los campos ópticos resultantes en cada una de las iteraciones con base en las condiciones experimentales y un conocimiento aproximado del objeto registrado [58,59,97,98]. Dentro de estas últimas variantes, se encuentra el algoritmo reportado por Rong et al. [63] que a partir de un solo registro de intensidad, permite recuperar mapas de fase que son muy similares a los que se introducen en las simulaciones.

Hasta el momento, bajo la condición de alta apertura numérica (AN) impuesta en DLHM, en la literatura especializada sólo se ha reportado una técnica que soportada en una arquitectura de tipo iterativa permite obtener medidas relativas de fase [68]. La principal desventaja de esta técnica es que requiere múltiples registros de intensidad con diferentes longitudes de onda para la iluminación [68]. Los resultados presentados para esta técnica se obtienen usando entre 11 y 20 registros, este requerimiento incrementa la complejidad experimental en gran manera y, además, dificultaría el estudio de muestras en tiempo real. Por último, como ya se mencionó anteriormente, no ha sido posible reproducir los resultados de esta técnica a pesar de haber contactado a los autores.

2.1. Algoritmo Gerchberg-Saxton (GS) y de Reducción de Error (RE)

El algoritmo Gerchberg-Saxton (GS) fue propuesto inicialmente por Gerchberg y Saxton [56,57], de ahí su nombre. Este algoritmo sirvió como pilar para desarrollar toda la familia de algoritmos iterativos de recuperación de fase que existen en la actualidad. Este algoritmo permite recuperar la información de un objeto

$$f(x) = |f(x)| \exp[i\phi(x)] \quad (2.1)$$

partiendo de dos medidas de intensidad conocidas. Estas medidas de intensidad deben estar ubicadas en el plano del objeto y en el plano de difracción (holograma); además de esto, se requiere que los campos ópticos estén relacionados por medio de una transformada de Fourier o de un método numérico de difracción que cumpla las condiciones experimentales. Inicialmente el algoritmo se propuso utilizando transformadas de Fourier y en este caso la relación estaría dada por

$$F(u) = |F(u)| \exp[i\psi(u)] = \text{FFT}\{f(x)\}, \quad (2.2)$$

donde se considera sólo el caso unidimensional sin perder generalidad y, x y u representan las coordenadas en los planos del objeto y de difracción, respectivamente.

La finalidad del algoritmo GS es entonces recuperar $\phi(x)$ a partir de los registros de amplitud $|F(u)|$ y $|f(x)|$. Estos registros de amplitud pueden ser calculados a partir de las imágenes de intensidad registradas, simplemente tomando su raíz cuadrada en cada punto. Durante la ejecución del algoritmo las imágenes de amplitud obtenidas se usan en conjunto con la información de fase recuperada en cada iteración para construir campos ópticos complejos. Para iniciar la ejecución del algoritmo, es fundamental construir un campo complejo estimado para el objeto, como sólo se cuenta con información de amplitud, es necesario generar información de fase para construir el campo complejo. Por ejemplo, si se tiene conocimiento previo del objeto, la información puede ser generada utilizando una estimación o una fase similar a la que se espera tenga el objeto. Si no se cuenta con este conocimiento previo, se recomienda entonces que la fase sea generada aleatoriamente en una distribución uniforme con valores entre $-\pi$ y π [56]. Es importante tener en cuenta que las condiciones iniciales que se den como entradas del algoritmo juegan un papel muy importante y determinan la posibilidad de llegar a una respuesta correcta [99].

Como ya se mencionó, la estructura del algoritmo es de tipo iterativa y ésta se describe en el esquema mostrado en la Figura 2-1. Teniendo como referencia este esquema, el algoritmo se puede describir en los siguientes cuatro pasos:

(a) Tomar la FFT de la función compleja estimada para el objeto, $g_k(x)$, para obtener

$$G_k(u) = |G_k(u)| \exp[i\beta_k(u)] \text{ en el plano de difracción.}$$

(b) Reemplazar el módulo de $G_k(u)$ por $|F(u)|$, el módulo de la función del campo difractado, con el fin de obtener una función $G'_k(u)$ estimada para el plano de difracción, dada por $G'_k(u) = |F(u)| \exp[i\beta_k(u)]$.

$$G'_k(u) = |F(u)| \exp[i\beta_k(u)].$$

(c) Tomar la IFFT de la función estimada para el plano de difracción, $G'_k(u)$, para obtener $g'_k(x) = |g'_k(x)| \exp[i\alpha'_k(x)]$ en el plano del objeto.

(d) Reemplazar el módulo de $g'_k(x)$ por $|f(x)|$ para obtener un nuevo estimado del objeto $g_{k+1}(x) = |f(x)| \exp[i\alpha'_k(x)]$.

Después de realizar el paso (d) el algoritmo puede volver al paso (a) cada vez que sea necesario, formando un bucle de iteración. En este algoritmo y en los que se presentan más adelante, las FFT e IFFT se usan como método de propagación, pero pueden ser reemplazadas por un método numérico que permita cumplir con las condiciones experimentales requeridas como, por ejemplo, espectro angular [59,79,80]. Adicional a los cuatro pasos ya descritos, el algoritmo se puede describir con ecuaciones, en cuyo caso, la k-ésima iteración está dada por:

$$G_k(u) = |G_k(u)| \exp[i\beta_k(u)] = \text{FFT}\{g_k(x)\}, \quad (2.3)$$

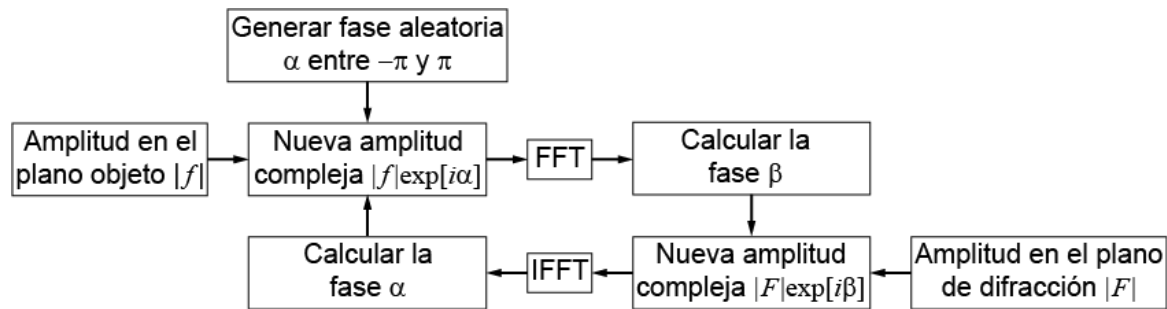
$$G'_k(u) = |F(u)| \exp[i\beta_k(u)], \quad (2.4)$$

$$g'_k(x) = |g'_k(x)| \exp[i\alpha'_k(x)] = \text{IFFT}\{G'_k(u)\} \text{ y} \quad (2.5)$$

$$g_{k+1}(x) = |f(x)| \exp[i\alpha_{k+1}(x)] = |f(x)| \exp[i\alpha'_k(x)], \quad (2.6)$$

donde g_k , α_k , G'_k y β_k son estimaciones de f , ϕ , F y ψ , respectivamente [58].

Figura 2-1: Esquema para el algoritmo Gerchberg-Saxton (GS).



El proceso iterativo se debe repetir hasta que el error cuadrático medio de alguna de las dos distribuciones, en el plano del objeto o de difracción, sea menor o igual a un valor umbral definido. Este tipo de algoritmos también se conoce en alguna literatura como de reducción de error debido a que en cada una de las iteraciones el error debe permanecer igual o disminuir [56–58]. El error cuadrático medio mide la diferencia entre la amplitud recuperada en cada iteración y la amplitud registrada, este error en el plano de difracción está dado por

$$E_D = \frac{1}{M} \sum_u [|G_k(u)| - |F(u)|]^2 \quad (2.7)$$

y en el plano del objeto por

$$E_O = \frac{1}{M} \sum_x [|f(x)| - |g'_k(x)|]^2, \quad (2.8)$$

donde M es el número total de datos que componen las amplitudes registradas.

La simulación de los registros de amplitud típicamente necesarios en un algoritmo GS puede ser realizada fácilmente, se debe construir un campo complejo que represente el objeto bajo estudio y posteriormente, propagar este campo complejo con un método de propagación adecuado, esto último, para simular el proceso de registro del holograma. En la Figura 2-2 se muestran las imágenes usadas para simular los registros de amplitud necesarios en una metodología del tipo GS. Para obtener la imagen en la Figura 2-2 (c), como se mencionó anteriormente, primero se compone un campo complejo utilizando la amplitud y la fase mostradas en (a) y (b), respectivamente. Después de esto, el campo complejo es propagado a una distancia $d = 10 \text{ cm}$, utilizando una iluminación plana con longitud de onda $\lambda = 633 \text{ nm}$ y el método de espectro angular. Las imágenes se componen por 512×512 píxeles y un tamaño de pixel de $5 \mu\text{m}$. Para finalizar, al campo complejo resultante en el plano de difracción se le calcula su módulo y la imagen que se obtiene es

considerada como la amplitud medida en el plano de difracción. Las imágenes en la Figura 2-2 (a) y (c), son las que posteriormente se utilizan como entradas del algoritmo GS.

Después de aplicar el algoritmo GS se obtienen los resultados que se presentan en la Figura 2-3, en los cuadros (a) y (b) se presentan la amplitud y fase obtenidos por reconstrucción directa, es decir, por la propagación de la imagen en la Figura 2-2 (c) a una distancia de -10 cm. En estas imágenes se pueden distinguir formas similares a las que se introdujeron originalmente, pero es evidente que están perturbadas por el ruido de la imagen gemela y no representan datos útiles para realizar medidas del objeto bajo estudio. La fase además de estar afectada por la imagen gemela presenta un problema adicional y es que está oscurecida por una distribución que se asemeja a la amplitud del objeto. En los cuadros (c) y (d) de la Figura 2-3 se presentan las distribuciones de amplitud y fase obtenidas después de 200 iteraciones del algoritmo GS. Los valores recuperados son diferentes de los que se introdujeron originalmente, pero la distribución de estos valores o su forma funcional es similar a la original; en amplitud se puede observar claramente la imagen de Lena y en fase, no tan clara, pero distinguible la imagen del oso. En la fase la imagen tiene una apariencia plana debido a unos pocos píxeles que tienen valores extremos cercanos a $-1,5$ rad, causando problemas en la representación.

Figura 2-2: Simulación de los registros de amplitud necesarios para aplicar el algoritmo GS. (a) Distribución de amplitud del objeto (Lena). (b) Distribución de fase del objeto (Oso). (c) Distribución de amplitud en el plano de difracción.

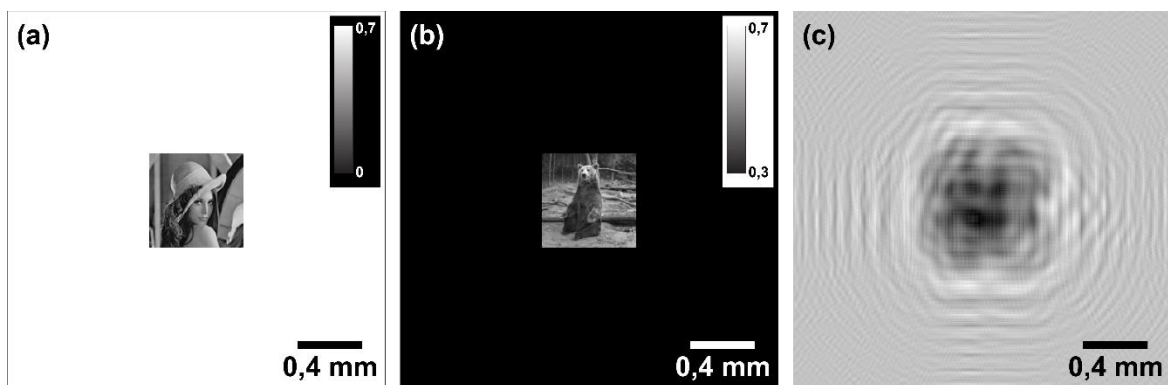
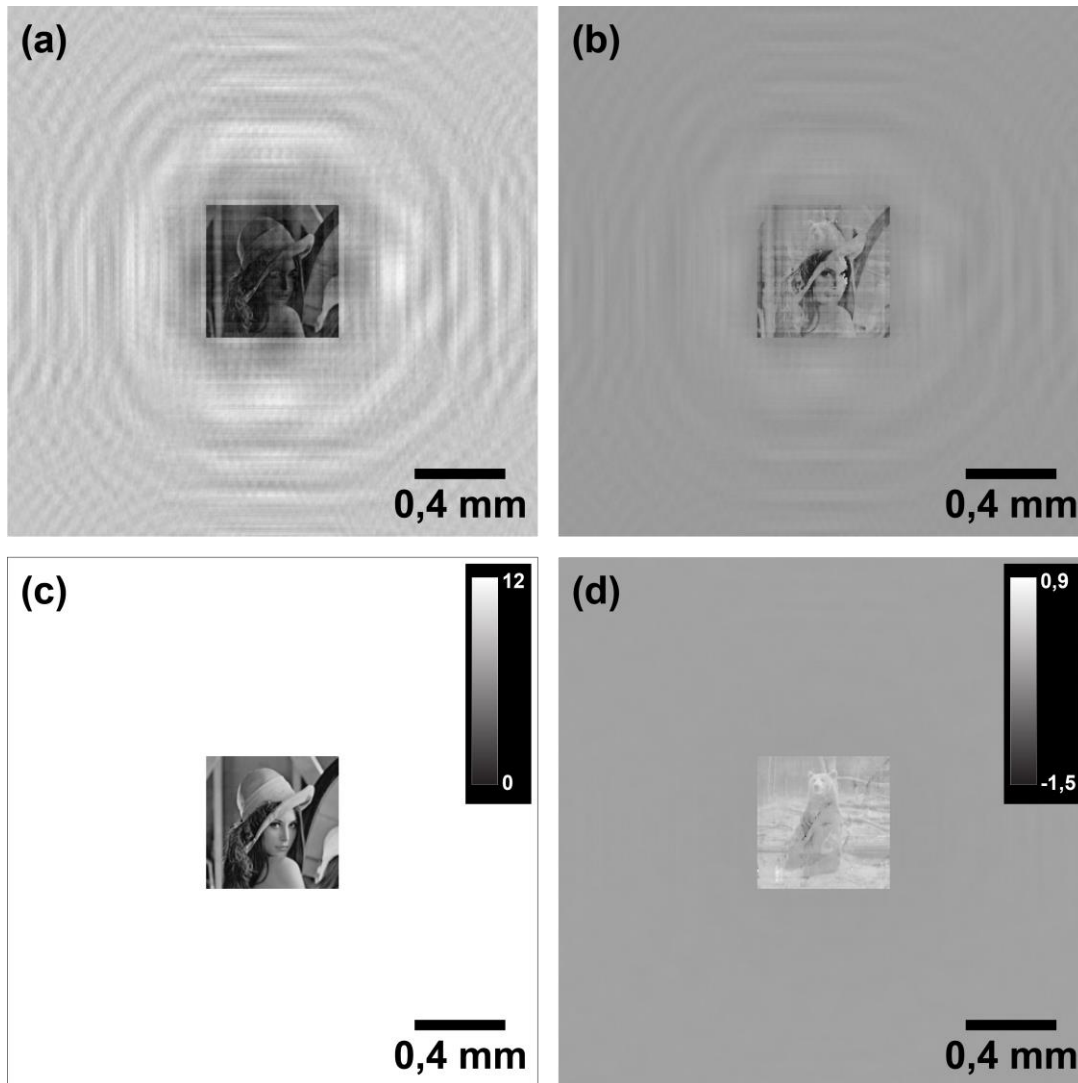


Figura 2-3: Resultados del algoritmo GS para las imágenes de entrada en la Figura 2-2. (a) y (b) Amplitud y fase recuperadas a través de reconstrucción directa. (c) y (d) Amplitud y fase recuperadas después de 500 iteraciones.



Las metodologías de tipo GS no convergen a una única solución debido a que la información que se tiene para recuperar la distribución de fase está directamente relacionada con las intensidades en el plano del objeto y de difracción [56,57]. Por ejemplo, si se toma una amplitud compleja que produzca un patrón de intensidad determinado, y se le añade un valor de fase constante y arbitrario, este campo sigue produciendo la misma distribución de intensidad en el plano de difracción. Por esto, sólo se pueden tener medidas de fase relativas más que absolutas. Además, se ha demostrado que el resultado de este tipo de técnicas está fuertemente ligado a la fase inicial [99], que como ya se mencionó

anteriormente, puede ser una distribución generada de manera aleatoria o una estimación del objeto particular.

Dentro de los algoritmos GS se encuentra una variación aplicable a situaciones en las que se cuenta sólo con una medida de intensidad o amplitud en el plano de difracción, generalmente esta variante es la que recibe el nombre de algoritmo de reducción de error [58,97]. En la Figura 2-4 se muestra el diagrama de bloques de esta variante. Las amplitudes complejas $g(x)$ y $G'(u)$ se obtienen satisfaciendo restricciones impuestas en sus respectivos dominios, por ejemplo, la nueva versión de $g(x)$ que se obtiene en el paso (d), ahora se puede obtener a partir de $g'(x)$ reemplazando la Ecuación (2.6) por

$$g_{k+1}(x) = \begin{cases} g'_k(x), & x \notin \gamma \\ 0, & x \in \gamma \end{cases}, \quad (2.9)$$

donde γ representa el conjunto de puntos en los que $g'(x)$ no satisface las restricciones deseadas para el objeto. Por ejemplo, si el objeto es real, los puntos donde $g'(x)$ sea negativo o también, en las regiones que se sepa que el objeto no está presente debido a un conocimiento aproximado de su forma y ubicación [58,59,97]. Los campos complejos G y G' se obtienen de manera similar al algoritmo GS.

El gran problema de las metodologías GS y de reducción de error es el tiempo de convergencia, generalmente el error calculado usando las ecuaciones (2.7) y (2.8) decrece rápidamente al iniciar la ejecución del algoritmo, pero después se estanca, es decir, permanece constante por muchas iteraciones y en algunos casos, comienza a decrecer después de esto pero de manera mucho más lenta [58,97]. En la Figura 2-5 se puede observar el error cuadrático medio como función del número de iteraciones que han transcurrido. Después de 20 iteraciones, el error comienza a decrecer de manera muy lenta y cuando llega a las 50 iteraciones es prácticamente estacionario. Este problema ha sido ampliamente estudiado y por esta razón se han propuesto diferentes alternativas que permiten que los algoritmos de recuperación de fase tengan una convergencia mucho más rápida, un ejemplo, son los algoritmos de Entrada – Salida [58,59,97].

Figura 2-4: Diagrama de bloques para el algoritmo de reducción de error.

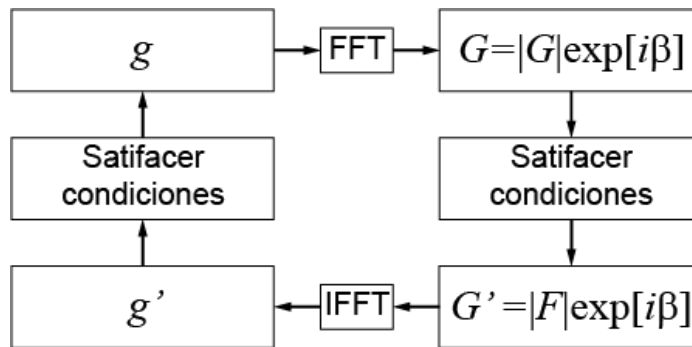
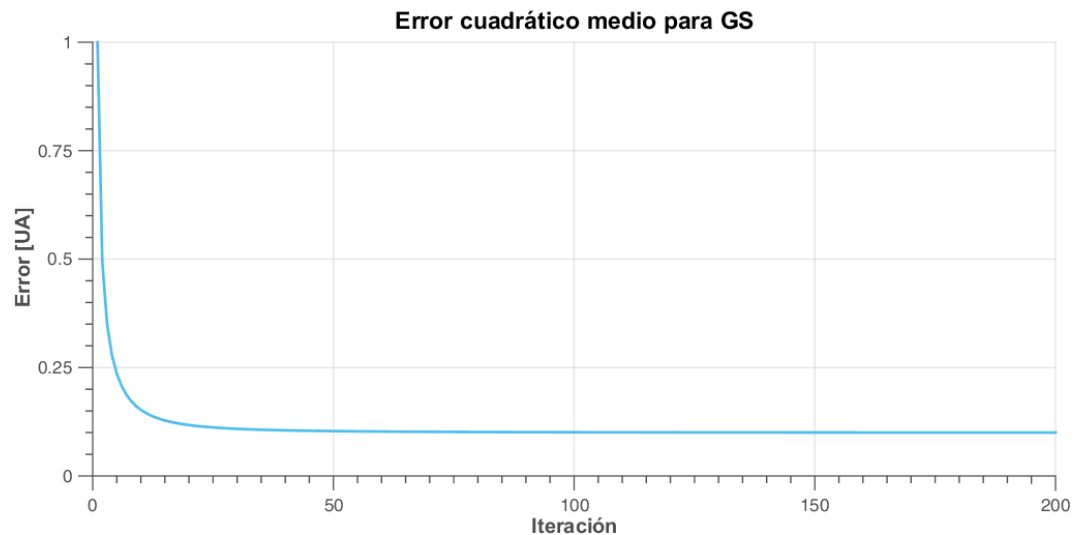


Figura 2-5: Error cuadrático medio para las imágenes de entrada en los cuadros (a) y (c) de la Figura 2-2.



2.2. Algoritmos de entrada-salida (ES)

Debido a la lenta convergencia de los algoritmos GS y RE, se desarrollaron otras alternativas como solución, entre las cuales se encuentran los algoritmos de entrada-salida que han demostrado una convergencia más rápida en problemas de una [97,100] y dos medidas de intensidad [101,102]. Esta familia de algoritmos está soportada en los de reducción de error, la principal diferencia radica en las operaciones y restricciones que se aplican para los campos complejos en el plano del objeto. Los pasos (a), (b) y (c) del algoritmo del algoritmo GS nuevamente se tienen como base y el paso (d) es el que cambia. Los pasos (a), (b) y (c) se pueden agrupar y tratarlos como que fueran un sistema

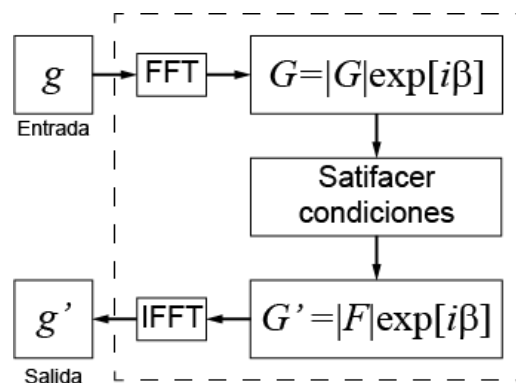
no lineal con una entrada $g(x)$ y una salida $g'(x)$ [103], como se muestra en la Figura 2-6.

Cuando el algoritmo se analiza de esta manera, se hace evidente que $g'(x)$ es una función compleja que satisface las condiciones y restricciones impuestas en el plano de difracción. Si además de esto, $g'(x)$ se modifica de tal manera que cumpla las condiciones del plano objeto para obtener $g(x)$, entonces se puede encontrar una solución al problema de recuperación de fase utilizando $g(x)$ como una función que realimenta el sistema para obtener una nueva salida $g'(x)$. Siguiendo esta línea, $g(x)$ no es una función estimada de $f(x)$ sino que como ya se dijo anteriormente, es una función que realimenta el sistema y al no ser una estimación del objeto no debe cumplir las restricciones del plano del objeto brindando así, una gran flexibilidad en el momento de elegir la siguiente entrada del sistema.

La salida del sistema no lineal, $g'(x)$, es una función que refleja todos los cambios realizados en la entrada $g(x)$. Por esto tiene sentido que la siguiente entrada del sistema sea una versión modificada de $g(x)$ en todos los puntos que no satisfacen las condiciones requeridas, lo que se busca entonces es compensar la entrada del sistema por los errores de la salida. En la versión básica del algoritmo de entrada-salida, la siguiente entrada del algoritmo está dada por

$$g_{k+1}(x) = g_k(x) + \rho \Delta g_k(x), \quad (2.10)$$

Figura 2-6: Diagrama de bloques para el algoritmo de entrada-salida [103].



donde ρ es una constante real que cumple $0 < \rho < 1$ y recibe el nombre de parámetro de relajación, y $\Delta g_k(x)$ está dado por

$$\Delta g_k(x) = \begin{cases} 0, & x \notin \gamma \\ -g'_k(x), & x \in \gamma \end{cases} \quad (2.11)$$

y representa las variaciones que se desean introducir en $g_k(x)$. El conjunto de puntos γ igual que en la Ecuación (2.9) está compuesto por todos los puntos en los que $g'_k(x)$ no satisface las condiciones del plano objeto. Cuando se reemplaza la Ecuación (2.11) en la Ecuación (2.10) se obtiene

$$g_{k+1}(x) = \begin{cases} g_k(x), & x \notin \gamma \\ g_k(x) - \rho g'_k(x), & x \in \gamma \end{cases} \quad (2.12)$$

La Ecuación (2.6) en el algoritmo GS debe ser reemplazada por la Ecuación (2.12) para obtener la versión básica del algoritmo de entrada-salida.

Otras variantes de los algoritmos de entrada-salida, se pueden obtener utilizando diferentes versiones de la Ecuación (2.12). La primera variante, conocida como el algoritmo de salida-salida, reemplaza los $g_k(x)$ presentes en el lado derecho de la Ecuación (2.12) por $g'_k(x)$. Realizando este cambio, se obtiene entonces que la nueva entrada del algoritmo va a estar determinada únicamente por la última salida del algoritmo. El algoritmo de salida-salida reemplaza la Ecuación (2.6) por

$$g_{k+1}(x) = \begin{cases} g'_k(x), & x \notin \gamma \\ g'_k(x) - \rho g'_k(x), & x \in \gamma \end{cases} \quad (2.13)$$

El algoritmo de salida-salida al igual que las metodologías GS y RE sufre de problemas de estancamiento [58,59]. Un intento por solucionar este problema derivó en el algoritmo híbrido de entrada-salida, el cual combina la primera línea de la Ecuación (2.13) y la segunda línea de la Ecuación (2.12):

$$g_{k+1}(x) = \begin{cases} g'_k(x), & x \notin \gamma \\ g_k(x) - \rho g'_k(x), & x \in \gamma \end{cases} \quad (2.14)$$

Para aplicar el algoritmo híbrido de entrada-salida, la Ecuación (2.6) debe ser reemplazada por la Ecuación (2.14).

Como ya se mencionó anteriormente, en los algoritmos de entrada-salida la función de entrada $g(x)$ no representa una estimación del objeto, entonces no tiene sentido determinar el error en cada iteración utilizando la Ecuación (2.7) para E_D . El error debe ser calculado utilizando

$$E_O = \sum_{x \in \gamma} [g'_k(x)]^2, \quad (2.15)$$

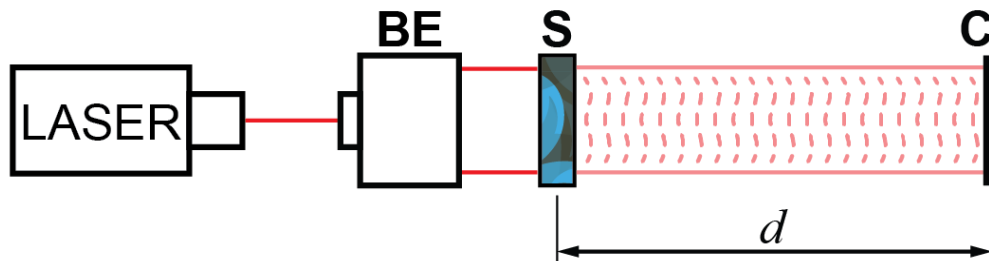
que es una versión de la Ecuación (2.8) aplicable a los problemas de determinación de fase a partir de un solo registro de intensidad.

2.3. Algoritmo de Rong

El algoritmo iterativo presentado por Rong et al. en el 2013 [63] es un algoritmo híbrido de entrada-salida que permite recuperar medidas cuantitativas de fase a partir de un único registro de intensidad. El algoritmo funcionalmente se describe con los mismos pasos y ecuaciones mencionadas en la sección anterior para las metodologías híbridas de entrada-salida y para determinar el conjunto de puntos no válidos representado como γ , se usa una función de soporte y un par de condiciones que se describen más adelante. Además, como condiciones iniciales para el algoritmo se usan la amplitud y fase obtenidas por reconstrucción directa del holograma registrado, asegurando así la convergencia del algoritmo a una solución correcta.

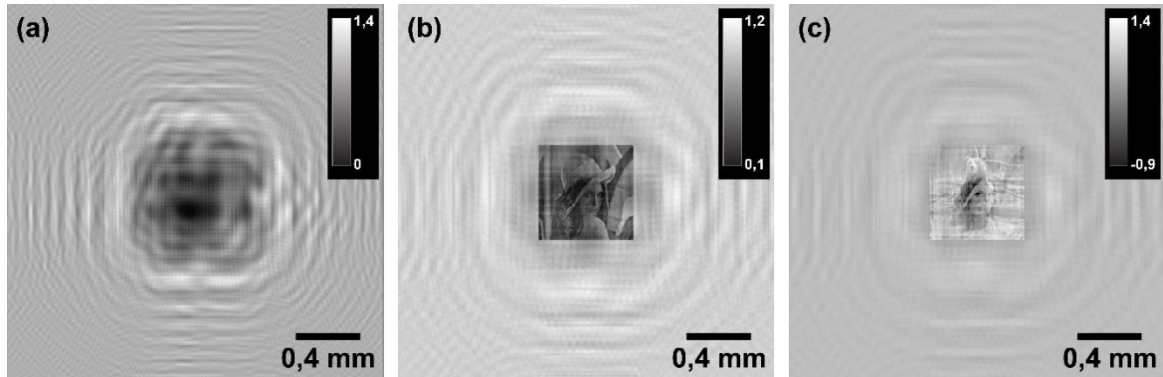
El algoritmo está diseñado para trabajar con registros de intensidad adquiridos en sistemas holográficos en línea con ondas planas como el que se muestra en la Figura 2-7. Por este motivo, se da una breve descripción de este tipo de montajes que se puede entender de la siguiente manera: un haz de luz coherente (LASER), con longitud de onda λ , incide en un expansor de haz (BE) a partir del cual se obtienen ondas planas. Las ondas planas posteriormente iluminan una muestra (S), produciendo un patrón de difracción que al propagarse en el espacio libre se registra en un sensor digital (C) ubicado a una distancia d de la muestra. A diferencia de los sistemas DLHM, la distancia d en esta configuración tiene valores típicos en el orden de cm; y además, como se ilumina la muestra con ondas planas la magnificación del patrón de difracción tiene un valor cercano a 1.

Figura 2-7: Esquema simplificado de la configuración de registro en un sistema holográfico en línea con ondas planas. BE: expansor de haz, S: muestra, C: medio de registro digital, Línea continua: haz de referencia y Línea discontinua: haz objeto.



La reconstrucción de los hologramas se lleva a cabo utilizando un método de difracción numérico que cumpla los requisitos impuestos por el montaje experimental como por ejemplo, espectro angular [79,80]. En el algoritmo de Rong et al. se propone que no se debe usar el holograma registrado para la reconstrucción, sino el holograma normalizado que se obtiene al dividir el holograma registrado con la muestra presente por el holograma registrado sin la muestra presente, que no es otra cosa que la intensidad de la onda de referencia en el plano de registro. Trabajar con el holograma normalizado reduce la influencia de la intensidad de la luz, la sensibilidad de la cámara y además, la escala de intensidad de las imágenes se minimiza [104]. En la Figura 2-8 se presenta el holograma normalizado obtenido de la simulación presentada en la Figura 2-2, donde la amplitud real del objeto toma valores entre 0,3 y 1,0, y el cambio de fase introducido por la muestra al esparcir la onda de referencia es de 0,7 rad. Además, en la Figura 2-8 se presentan las reconstrucciones en amplitud y fase del holograma normalizado, donde es evidente la presencia de la imagen gemela. Cuando se reconstruye el holograma convencional (sin normalizar), las reconstrucciones en amplitud y fase toman valores en los intervalos [17,6 UA, 213,0 UA] y [-0,9 rad, 1,4 rad] respectivamente; mientras que si se reconstruye el holograma normalizado, la amplitud toma valores en el intervalo [0,1 UA, 1,2 UA] y la fase no cambia su rango de valores, esto evidencia que al trabajar con el holograma normalizado se logra reducir la escala de intensidad en la reconstrucción en amplitud, pero los valores de fase no se ven afectados.

Figura 2-8: Reconstrucción de un holograma normalizado obtenido usando el holograma de la simulación presentada en la Figura 2-2. (a) Holograma normalizado. (b) y (c) Reconstrucción en amplitud y fase, respectivamente, del holograma normalizado.



El algoritmo iterativo se puede describir en los siguientes pasos:

- (a) Reconstruir el holograma normalizado con el fin de obtener una estimación inicial $g_1'(x)$ para el objeto.
- (b) Usar metodologías de detección de bordes y el conocimiento previo del objeto, con el fin de obtener una función de soporte $S(x)$ que sirva para determinar las regiones en las que se encuentra presente el objeto. Esta función de soporte puede ser binaria, con valores de 1 en las regiones donde esté presente el objeto y de 0 en las regiones donde no esté presente.
- (c) Reemplazar por 1 los valores de $g_k'(x)$ que no se encuentren dentro de la función de soporte S . Esta condición viene de trabajar con el holograma normalizado, en las regiones donde no está presente el objeto la función de transmitancia (objeto) debe valer 1, con el fin de representar el no esparcimiento de la onda de referencia, es decir, que no se absorbe energía y que no se introduce ningún cambio de fase.
- (d) Modificar los valores que se encuentren dentro del soporte S y que no cumplan una condición de no negatividad. Las partes real e imaginaria que se encuentren dentro del soporte deben ser positivas, los valores negativos se deben a la interferencia entre la imagen gemela y la onda de referencia. Esta condición se debe aplicar en la parte real e imaginaria si el objeto es de amplitud y fase o solamente en la parte real si el objeto es de amplitud. Como en los algoritmos

híbridos de entrada-salida, esta modificación se da en la forma de la Ecuación (2.14) para evitar el estancamiento del algoritmo. Esto sería

$$g_k(x) = \begin{cases} g'_k(x), & x \notin \gamma \\ g_{k-1}(x) - \rho g'_k(x), & x \in \gamma \end{cases} \quad (2.16)$$

donde γ representa los puntos que pertenecen a S y no cumplen la condición de no negatividad y ρ , de nuevo es el parámetro de relajación. Cuando $k=1$, la Ecuación (2.16) se debe remplazar por

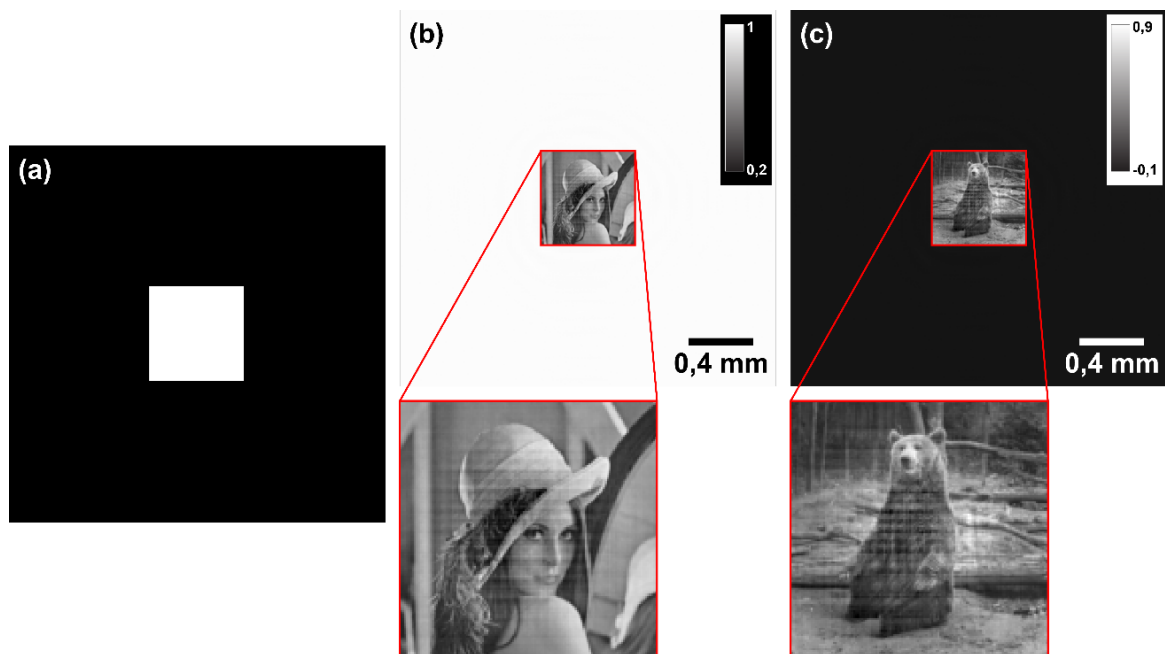
$$g_1(x) = \begin{cases} g'_1(x), & x \notin \gamma \\ g'_1(x) - \rho g'_1(x), & x \in \gamma \end{cases}.$$

- (e) Propagar la nueva función estimada del objeto, $g_k(x)$, hasta el plano del holograma para obtener $G_k(u) = |G_k(u)| \exp[i\beta_k(u)]$.
- (f) Remplazar el módulo de $G_k(u)$ por la raíz cuadrada del holograma normalizado para obtener una nueva función $G'_k(u)$ estimada para el campo complejo en el plano de registro, dada por $G'_k(u) = |F(u)| \exp[i\beta_k(u)]$, donde $|F(u)|$ representa la raíz cuadrada del holograma normalizado y es la condición que se impone en la magnitud plano de registro.
- (g) Propagar la nueva función estimada para el plano de registro, $G'_k(u)$, hasta el plano del objeto para obtener $g'_{k+1}(x) = |g'_{k+1}(x)| \exp[i\alpha'_{k+1}(x)]$ para realimentar el algoritmo en el paso (c).

Para poner a prueba el algoritmo de Rong, se usa como entrada el holograma normalizado en la Figura 2-8 (a), una función de soporte como la que se muestra en la Figura 2-9 (a) que coincide exactamente con la región en la cual se encuentra ubicado el objeto y un parámetro de relajación $\rho = 0,8$. Después de 500 iteraciones se obtienen la amplitud y la fase que se muestran respectivamente en los cuadros (b) y (c) de la Figura 2-9. Cuando estas imágenes se comparan con las de la Figura 2-8, en ambos casos se puede ver que la imagen gemela se ha eliminado por completo en las regiones en las que no está presente el objeto y en el objeto su presencia se ha reducido de manera considerable. En la fase se puede observar que mientras en la Figura 2-8 (c) aparecía parte de la fotografía de Lena

(amplitud) en la región central, en la Figura 2-9 (c) ésta ya no aparece pero en cambio se distingue una región blanca que no estaba presente en la imagen utilizada para simular el holograma, ver Figura 2-2 (b). Además de esto, en la Figura 2-9 (c) se puede observar que las medidas de fase recuperadas ahora están en el intervalo $[-0,1 \text{ rad}, 0,9 \text{ rad}]$ mientras que los valores originales estaban en el intervalo $[0,3 \text{ rad}, 1,0 \text{ rad}]$. En la imagen de fase original la región donde no está presente el objeto tiene un valor de $0,3 \text{ rad}$ y en la recuperada tiene un valor de 0 rad , en principio esto se debe a la condición aplicada en el paso (c) del algoritmo y se hace evidente cuando en el paso (c) no se reemplaza por 1 sino por $\exp[i\alpha_0]$, en ese caso la imagen de fase recuperada tiene valores de α_0 en las regiones donde no está presente el objeto. Esto último refuerza lo que ya se había mencionado anteriormente y es que con las metodologías iterativas sólo se pueden recuperar valores relativos de fase y no valores absolutos. Por último, a pesar de que el rango de valores la fase recuperada es más amplio, la gran mayoría de los valores que componen el objeto se encuentran en el intervalo $[0,0 \text{ rad}, 0,7 \text{ rad}]$ diferenciándose de los valores originales por un desfase de $-0,3 \text{ rad}$.

Figura 2-9: Medidas recuperadas a partir del holograma simulado que se presenta en la Figura 2-8 (a). (a) Función de soporte que coincide con el tamaño del objeto. (b) y (c) Amplitud y fase recuperadas usando el algoritmo de Rong et al después de 500 iteraciones.



En el artículo original no se estudia la influencia de la función de soporte ni del parámetro de relajación en la convergencia y el desempeño del algoritmo. En algunas partes del texto se menciona que la función de soporte puede ser “suelta”, pero nunca se especifica a qué se refieren los autores con este término. La importancia de determinar la influencia de la función de soporte yace en que esta se obtiene por medio de detección de bordes y en algunas situaciones puede que no coincida exactamente con el objeto.

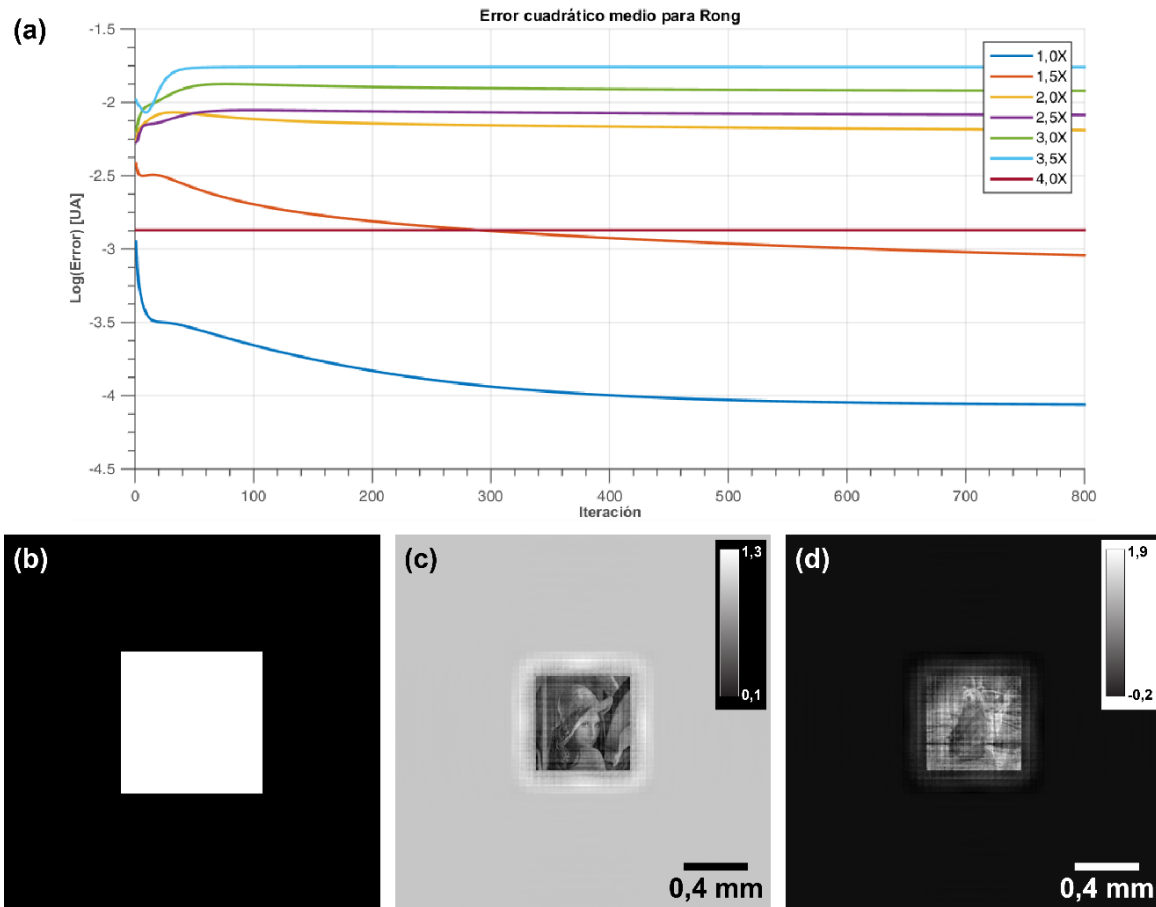
2.3.1 Influencia de la función de soporte

Con el fin de determinar la influencia de la función de soporte en el rendimiento del algoritmo de Rong, se usó el holograma normalizado que se presenta en la Figura 2-8 (a) y se corrió el algoritmo para diferentes tamaños de la función de soporte con un parámetro de relajación $\rho = 0,8$. La función de soporte en cada caso es un cuadrado centrado como el de la Figura 2-10 (b) y con una longitud lateral de nx pixeles donde x es el tamaño lateral del objeto y n toma valores entre 1,0 y 4,0 con pasos de 0,5.

Los resultados de las pruebas se presentan en la gráfica de la Figura 2-10 (a), sólo se presenta el error cuadrático medio hasta 800 iteraciones porque a partir de ahí todas las funciones permanecen aproximadamente constantes. En la gráfica se puede observar que para $1,0x$, es decir, cuando la función de soporte se ajusta exactamente con el objeto, la convergencia del algoritmo es mucho más rápida y alcanza el menor valor para el error, por lo tanto, se esperan los mejores resultados. Si se incrementa el tamaño de la función de soporte a $1,5x$, el algoritmo tiene una convergencia mucho más lenta, pero, aun así, el error decrece en cada iteración. Para valores más altos del tamaño de la función de soporte, por el contrario, el error aumenta o permanece constante a medida que avanza la ejecución del algoritmo.

En los cuadros (c) y (d) de la Figura 2-10 se muestran la amplitud y fase recuperadas con el algoritmo de Rong después de 500 iteraciones utilizando la función de soporte presentada en la Figura 2-10 (b), en las imágenes se pueden distinguir las figuras de Lena y el oso, pero es claro que las distribuciones recuperadas difieren en gran medida de las distribuciones originales. Basándose en estos resultados se puede decir que el tamaño y el ajuste de la función de soporte al objeto juegan un papel fundamental en el desempeño del algoritmo, no sólo mejorando la convergencia del mismo, sino permitiendo recuperar

Figura 2-10: Resultados de las pruebas para diferentes tamaños de la función de soporte para el holograma simulado que se presenta en la Figura 2-8 (a). (a) Error cuadrático medio para diferentes tamaños de la función de soporte. (b) Función de soporte para $1,5x$. (b) y (c) Amplitud y fase recuperadas usando el algoritmo después de 800 iteraciones.



medidas de fase que sean adecuadas y que a pesar de ser relativas correspondan a la fase original del objeto.

2.3.2 Influencia del parámetro de relajación

El parámetro de relajación se introduce para que los cambios introducidos en los puntos del campo de salida sean suaves y de esta manera evitar el estancamiento del algoritmo [58,63]. Con el fin de probar la influencia que tiene este parámetro en la ejecución del algoritmo de Rong, se usaron tres hologramas normalizados simulados a partir de distribuciones de amplitud y fase como las que se presentan en la Figura 2-2, pero con diferentes cambios de fase máximos $\Delta\phi_{\text{máx}}$, con valores de $3\pi/4$ rad, π rad y 2π rad. El

algoritmo se ejecutó utilizando una función de soporte que coincidía exactamente con el objeto y se tomaron valores del parámetro de relajación entre 0,1 y 0,9 con pasos de 0,1.

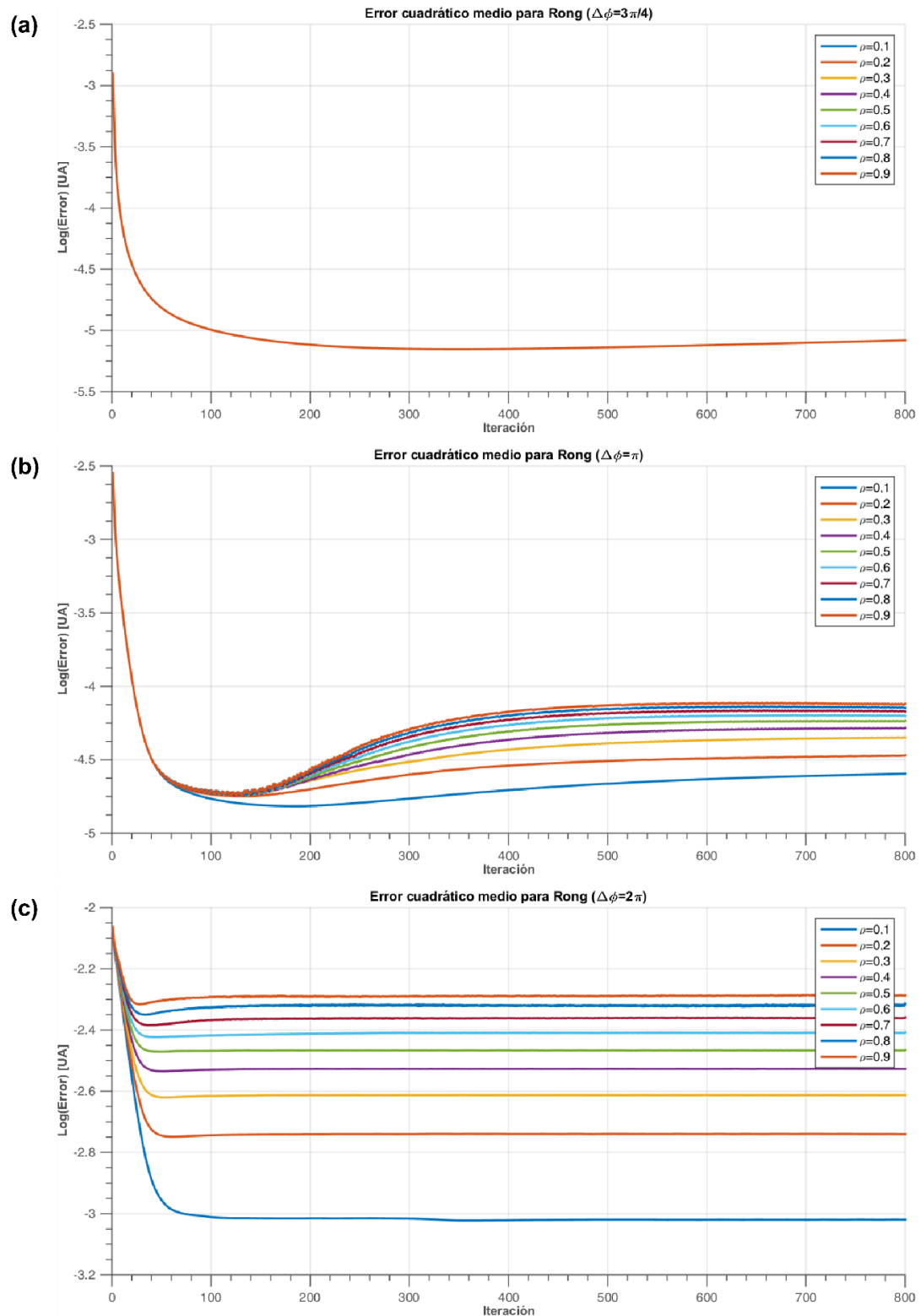
Los resultados se presentan en las gráficas de la Figura 2-11, de nuevo sólo se presenta el error cuadrático medio hasta 800 iteraciones porque a partir de ahí las funciones tenían un comportamiento aproximadamente constante. En la gráfica de la Figura 2-11 (a), correspondiente a $\Delta\phi_{\text{máx}} = 3\pi/4$ rad, sólo se distingue una línea porque todas las funciones de error tienen el mismo comportamiento sin importar el valor del parámetro de relajación.

En las gráficas de los cuadros (b) y (c), que corresponden a $\Delta\phi_{\text{máx}}$ con valores más altos, sí se puede evidenciar que, al cambiar el valor del parámetro de relajación el comportamiento del error cuadrático medio también cambia. Por ejemplo, la gráfica en la Figura 2-11 (b), para $\Delta\phi_{\text{máx}} = \pi$ rad, se puede ver que en las primeras iteraciones el comportamiento del error es el mismo todos los valores del parámetro de relajación, pero alrededor de la iteración número 100 la gráfica para $\rho = 0,1$ se desprende de las demás y alcanza un valor mínimo para el error alrededor de las 200 iteraciones; el resto de gráficas correspondientes a los demás valores de ρ , tienen un comportamiento no deseado ya que el error aumenta en gran medida y no alcanzan el valor mínimo del error obtenido para $\rho = 0,1$. Este comportamiento se hace más evidente a medida que aumenta el cambio máximo de fase introducido por el objeto, por ejemplo, en la gráfica de la Figura 2-11 (c) se presenta la gráfica correspondiente a un cambio máximo de fase igual a 2π rad, donde se pueden observar las diferentes funciones para los diferentes valores de ρ y de nuevo, es con $\rho = 0,1$ que se alcanza el menor valor para el error alrededor de las 100 iteraciones. También es notable que independientemente del valor asignado a ρ , todas las ejecuciones del algoritmo sufren problemas de estancamiento después de alcanzar un valor mínimo para el error.

Teniendo en cuenta los resultados de estas pruebas, se puede decir que el valor del parámetro de relajación se hace relevante a medida que el cambio de fase máximo introducido por un objeto crece. En las gráficas también se puede observar que a medida que el cambio máximo de fase aumenta el valor mínimo alcanzado para el error también lo hace, por lo cual se puede decir que el algoritmo de Rong permite obtener mejores

Figura 2-11: Resultados de las pruebas para diferentes valores del parámetro de relajación ρ con diferentes cambios de fase máximos $\Delta\phi$ introducidos por el objeto. (a)

$\Delta\phi_{\text{máx}} = 3\pi/4$. (b) $\Delta\phi_{\text{máx}} = \pi$. (c) $\Delta\phi_{\text{máx}} = 2\pi$.



resultados si el objeto no introduce fuertes cambios de fase al esparcir la onda de referencia.

2.4. Comparación de los diferentes métodos de RFMI

En este capítulo se describieron algunos de los diferentes métodos de recuperación de fase que se enmarcan en las técnicas iterativas. A grandes rasgos se pueden distinguir dos categorías, las técnicas que requieren una o dos medidas de intensidad para ejecutarse. A excepción de la técnica original propuesta por Gerchberg y Saxton [56,57], todas las que se describieron en este capítulo permiten recuperar las medidas de fase a partir de un único registro de intensidad [58,59,97]. El interés se centra particularmente en las últimas debido a que en DLHM típicamente se adquiere un solo registro de intensidad y, además, esto abriría posibilidades para realizar el estudio de eventos dinámicos que son de gran interés en diferentes campos de ciencia y tecnología [12,105–108].

Las técnicas de reducción de error y entrada-salida permiten recuperar las medidas de fase a partir de un único registro de intensidad, pero difieren conceptualmente y en su implementación. Las técnicas de reducción de error entienden la función $g'(x)$ como una estimación de la función compleja $f(x)$ que representa el objeto, por lo tanto $g'(x)$ debe cumplir las condiciones impuestas para el plano del objeto; mientras que en las técnicas de entrada-salida o salida-salida $g'(x)$ es simplemente una función que realimenta el algoritmo y que no debe cumplir las restricciones impuestas en el plano del objeto, lo cual brinda un grado más alto de libertad en el momento de modificarla para realimentar el algoritmo [59]. Además, mientras en los algoritmos de reducción de error cambian los datos que no cumplen las restricciones por 0 directamente, los de entrada-salida introducen el parámetro de relajación ρ con el fin de realizar cambios más suaves y de esta manera evitar el estancamiento del algoritmo [59,63], lo cual los convierte en una alternativa atractiva para la recuperación de fase.

El algoritmo de Rong técnicamente sólo requiere una medida de intensidad para su ejecución porque a pesar de requerir el holograma normalizado, este se obtiene a través de los registros de intensidad que se capturan cuando la muestra está presente y cuando no está y este último registro se debe obtener sólo una vez cada que se desea trabajar con

el montaje de DLHM. Además, como ya se dijo anteriormente se puede clasificar dentro de los algoritmos híbridos de entrada-salida y debido a los resultados que permite obtener y que se presentan en este capítulo se erige como una base sólida para un algoritmo de recuperación de fase en DLHM, claro está, teniendo en cuenta los diferentes retos que presenta trabajar en una arquitectura como la de DLHM, en términos de la apertura numérica y el escalamiento entre los planos de registro y de reconstrucción.

3. RFMI en DLHM (ondas esféricas y $AN > 0,3$)

La recuperación de medidas cuantitativas de fase en DLHM como ya se mostró anteriormente no es un asunto trivial, por esta razón, es un campo en el que se han hecho pocos desarrollos y esto se puede evidenciar en la literatura especializada, hasta el momento sólo se han reportado dos técnicas aplicables a DLHM: i) el método de compensación por Jericho et al. [65] y ii) el algoritmo de altas aperturas numéricas reportado por Bao et al. [68]. El primer método no soluciona el problema de la imagen gemela, sino que, como se mostró anteriormente, solamente elimina los factores de fase esféricos introducidos por la onda de iluminación en la reconstrucción, por lo cual, las medidas de fase obtenidas con esta técnica siguen estando perturbadas por la imagen gemela y no representan información confiable para realizar diagnósticos o estudios. La segunda técnica, que se puede enmarcar dentro de las metodologías iterativas, requiere varias mediciones de intensidad con diferentes longitudes de onda, lo cual la hace poco apropiada para el estudio de muestras dinámicas. Además, como ya se dijo anteriormente, sus resultados no ha sido posible reproducirlos a pesar de contactar a los autores originales del trabajo para obtener el código fuente que utilizaron para la publicación del artículo.

Las técnicas descritas en el capítulo anterior pueden ser aplicables a DLHM siempre y cuando se tengan en cuenta las diferentes restricciones impuestas por el montaje experimental [45,47]. Por ejemplo, el algoritmo de Rong se aplica utilizando Fresnel en su forma de convolución [48,81] o espectro angular [48,81], pero estos métodos no son funcionales bajo las condiciones de DLHM, por lo cual se deben usar métodos como el de la patente UN [47] y la aproximación de Rayleigh-Sommerfeld propuesta en [95] que funcionan para altas aperturas numéricas. Además de esto, DLHM presenta otros retos como el muestreo de la fase esférica en el plano de registro y la diferencia entre la distancia de reconstrucción y la distancia a la cual está ubicada la muestra realmente. Estos

problemas deben ser solucionados antes de adaptar a DLHM una metodología iterativa como las que se presentaron en el capítulo anterior.

3.1. El problema de RFMI con iluminación de ondas esféricas en DLHM

DLHM presenta diferentes retos numéricos que deben ser atendidos y solucionados con el fin de aplicar una metodología de tipo iterativa para la recuperación de medidas de fase. En esta sección se exponen cada uno de los problemas encontrados y propuestas para su solución.

3.2. Muestreo de la onda de referencia

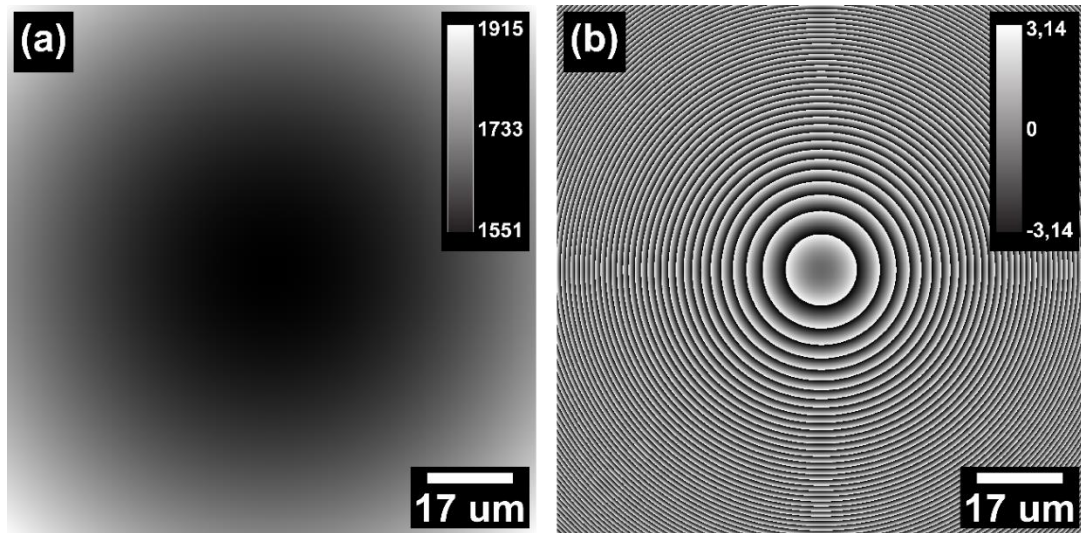
Cuando se trabaja numéricamente con ondas esféricas, en la mayoría de los casos, se obtienen mapas de fase envueltos debido al rango limitado que tiene la función arcotangente usada para obtener la fase a partir de los datos complejos. Para cualquier campo complejo, en este caso una onda de esférica $R(\mathbf{r}) = \exp(i\mathbf{kr})/r$, la fase está dada por la expresión

$$\phi(\mathbf{r}) = \arctan \left[\frac{\text{Im}\{R(\mathbf{r})\}}{\text{Re}\{R(\mathbf{r})\}} \right], \quad (3.1)$$

donde Re/Im representa la parte real/imaginaria. El rango de esta función está limitado al intervalo $[-\pi/2 \text{ rad}, \pi/2 \text{ rad}]$, pero si se conocen los signos de las partes real e imaginaria se puede extender hasta el intervalo $[-\pi \text{ rad}, \pi \text{ rad}]$. Al tener este rango limitado se obtienen valores de fase que son equivalentes a los originales, debido a la periodicidad de las funciones trigonométricas, pero están dentro del intervalo $[-\pi \text{ rad}, \pi \text{ rad}]$, por ejemplo, si la fase original tiene un valor de $2\pi \text{ rad}$, el valor de fase que se obtiene con la Ecuación (3.1) es de 0 rad .

En la Figura 3-1 se muestra la fase típica de una onda esférica, en el cuadro (a) se presenta la fase original kr y en el cuadro (b) la fase obtenida usando la Ecuación (3.1). En la fase original se puede evidenciar un incremento continuo de sus valores como función de la distancia medida desde el centro de la imagen hasta el punto de evaluación. En la fase envuelta, se presenta este mismo incremento, pero cuando el valor de fase supera $\pi \text{ rad}$

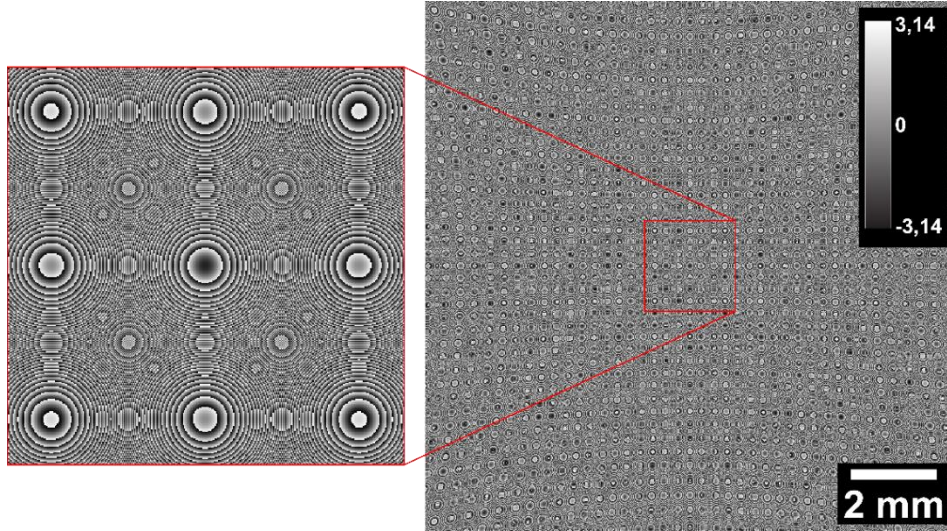
Figura 3-1: Fase de una onda esférica. (a) Fase original (desenvuelta). (b) Fase recuperada con la Ecuación (3.1) (envuelta).



se devuelve hasta $-\pi$ rad generando una serie de anillos concéntricos que aumentan de frecuencia como función de la distancia desde el centro de la imagen.

Debido a la naturaleza discreta de las señales digitales, estas deben ser registradas o simuladas de tal manera que se haga un correcto muestreo de ellas, con el fin de poder representar de manera fiel la señal original [48]. En general, debido a las condiciones experimentales de DLHM y los tamaños de pixel típicos de los sensores digitales, las ondas de referencia esféricas no pueden ser bien muestreadas. En el registro de los hologramas esta situación no representa un problema debido a que los sensores digitales detectan intensidad y no fase, mientras que en un algoritmo iterativo aplicable a DLHM el muestreo de la fase sí es importante ya que se trabaja con campos complejos. En la Figura 3-2 se presenta la fase de una onda esférica simulada como un campo complejo con parámetros típicos de DLHM ($AN=0,46$) y posteriormente obtenida con la Ecuación (3.1). en el recuadro rojo magnificado de la izquierda se puede ver que la fase, a diferencia de la presentada en la Figura 3-1 (b), está compuesta por varios conjuntos de anillos concéntricos cuando en realidad sólo debería ser un conjunto, este fenómeno se conoce como *aliasing* y se presenta debido al submuestreo de la señal.

Figura 3-2: Fase esférica simulada usando parámetros típicos de DLHM ($AN = 0,46$). En el recuadro rojo se puede observar el fenómeno de *aliasing* debido al submuestreo de la señal.



Para muestrear de manera correcta una señal digitalmente, se debe seguir el teorema de muestreo de Nyquist-Shannon [48], que para la fase de un campo óptico es equivalente a requerir que un cambio de fase de 2π rad sea registrado por al menos 3 pixeles. La fase de una onda esférica se puede escribir como

$$\phi(x, y, z) = \frac{2\pi}{\lambda} [x^2 + y^2 + z^2]^{1/2}, \quad (3.2)$$

donde λ es la longitud de onda y (x, y, z) representan las coordenadas medidas desde la fuente puntual. La Ecuación (3.2) se puede expresar de manera discreta como

$$\phi[m, n, z] = \frac{2\pi}{\lambda} [(m\Delta x)^2 + (n\Delta y)^2 + z^2]^{1/2}, \quad (3.3)$$

donde m y n son índices enteros y, Δx y Δy son las dimensiones físicas de los pixeles. Partiendo de la Ecuación (3.3), un cambio de fase $\Delta\phi$ entre dos posiciones diferentes en el plano de registro se puede escribir como

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \left\{ [(m_2\Delta x)^2 + (n_2\Delta y)^2 + z^2]^{1/2} - [(m_1\Delta x)^2 + (n_1\Delta y)^2 + z^2]^{1/2} \right\}. \quad (3.4)$$

Para evaluar el teorema de muestreo, se pueden elegir los índices de tal manera que las dos posiciones estén separadas por 3 pixeles y haciendo que el lado derecho de la igualdad sea menor o igual que 2π rad. Las frecuencias espaciales más altas se presentan en las esquinas de la imagen de fase y por esto se deben elegir índices que estén

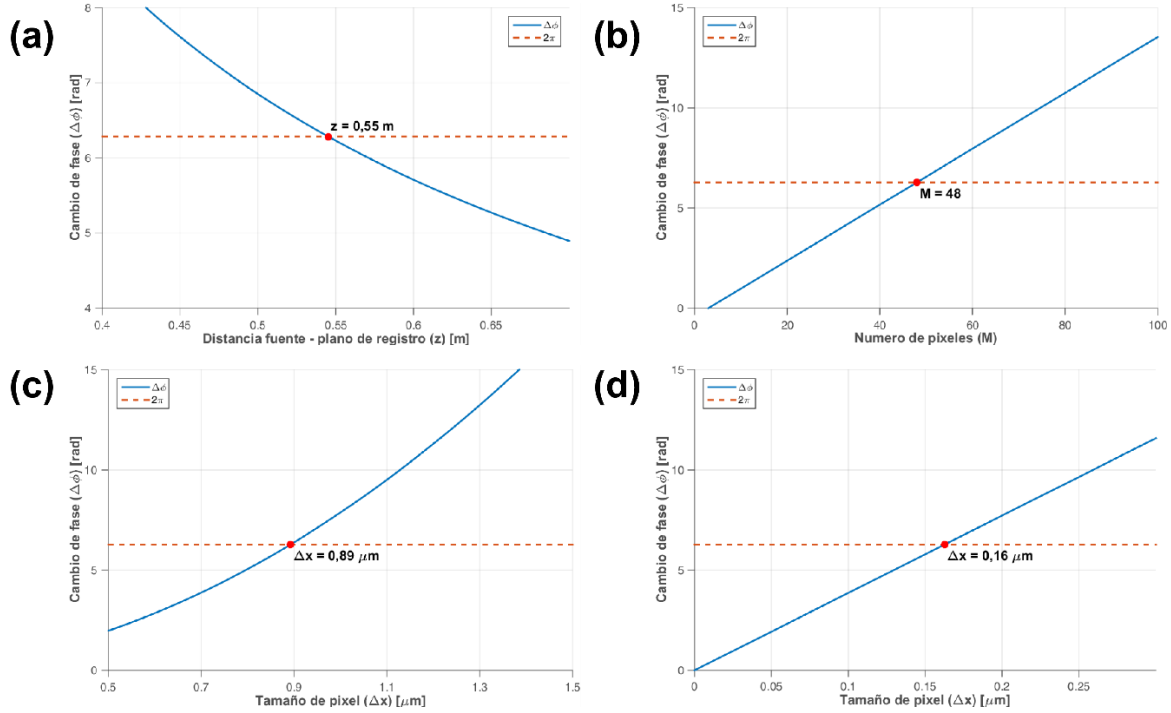
asociados a esas posiciones como por ejemplo $m_2 = n_2 = M/2$ y $m_1 = n_1 = (M/2) - 3$, donde M^2 representa la cantidad de pixeles. Si se asume que los pixeles son cuadrados, es decir, que $\Delta x = \Delta y$, la expresión en el lado derecho de la Ecuación (3.4) se puede volver más simple y la condición para muestrear bien la onda esférica sería

$$2\pi \geq \frac{2\pi}{\lambda} \left\{ \left[2 \left(\frac{M}{2} \Delta x \right)^2 + z^2 \right]^{1/2} - \left[2 \left(\frac{M}{2} \Delta x - 3\Delta x \right)^2 + z^2 \right]^{1/2} \right\}. \quad (3.5)$$

En la Ecuación (3.5) aparecen los parámetros geométricos de un montaje experimental de DLHM, para estudiar la dependencia con cada parámetro se puede solucionar numéricamente la desigualdad presentada utilizando parámetros como los de la fase presentada en la Figura 3-2 y variando sólo el parámetro de interés. Los parámetros son $\lambda = 405 \text{ nm}$, $M = 2048$, $\Delta x = 6 \mu\text{m}$, $W = M\Delta x = 12,288 \text{ mm}$ y $z = 12 \text{ mm}$. En la Figura 3-3 se presentan las gráficas que representan la solución numérica de la desigualdad en la Ecuación (3.5) para los parámetros z , M y Δx , las líneas azules representan el cambio de fase $\Delta\phi$ como función del parámetro de interés, las líneas rojas punteadas representan el valor $2\pi \text{ rad}$ y los puntos rojos son los puntos de interés para definir los intervalos que son solución de la Ecuación (3.5).

En la Figura 3-3 (a) se presenta el cambio de fase como función de la distancia entre la fuente puntual y el plano de registro, en la gráfica se puede observar que el cambio de fase toma un valor de $2\pi \text{ rad}$ cuando $z = 0,55 \text{ m}$, además, el cambio de fase es menor que $2\pi \text{ rad}$ cuando $z \geq 0,55 \text{ m}$, un valor alrededor de 55 veces mayor que el z propuesto. Las gráficas en los cuadros (b) y (c) de la Figura 3-3 se pueden interpretar de igual manera que la anterior y de esta manera se obtiene que el cambio de fase es menor que $2\pi \text{ rad}$ cuando $M \leq 48$ pixeles o cuando $\Delta x \leq 0,89 \mu\text{m}$, respectivamente, mientras el resto de parámetros mantienen los valores mencionados anteriormente. Estas tres soluciones, permiten obtener como máximo una apertura numérica de 0,08, un valor que debido a la gran importancia que tiene la AN, convierte DLHM en una alternativa poco atractiva. Por ejemplo, si se quiere mantener la AN y estudiar la dependencia con el tamaño de pixel, la Ecuación (3.5) se puede reescribir como

Figura 3-3: Soluciones de las desigualdades en las Ecuaciones (3.5) y (3.6) como función de los diferentes parámetros de interés.



$$2\pi \geq \frac{2\pi}{\lambda} \left\{ \left[2 \left(\frac{W}{2} \right)^2 + z^2 \right]^{1/2} - \left[2 \left(\frac{W}{2} - 3\Delta x \right)^2 + z^2 \right]^{1/2} \right\}. \quad (3.6)$$

La solución de la desigualdad en la Ecuación (3.6) se presenta gráficamente en la Figura 3-3 (d), en este caso el cambio de fase es menor que 2π rad cuando se cumple que $\Delta x \leq 0,16 \mu\text{m}$. Si se toma el valor máximo posible, $\Delta x = 0,16 \mu\text{m}$, el problema se hace evidente ya que en el momento no existen cámaras digitales o sensores con ese tamaño de pixel, y suponiendo que existiera una, tendría que estar compuesta por 76800^2 pixeles para lograr que W mantenga su valor, una cantidad de datos, que incluso con la capacidad computacional actual, es extremadamente difícil de procesar y tomaría una gran cantidad de tiempo hacerlo.

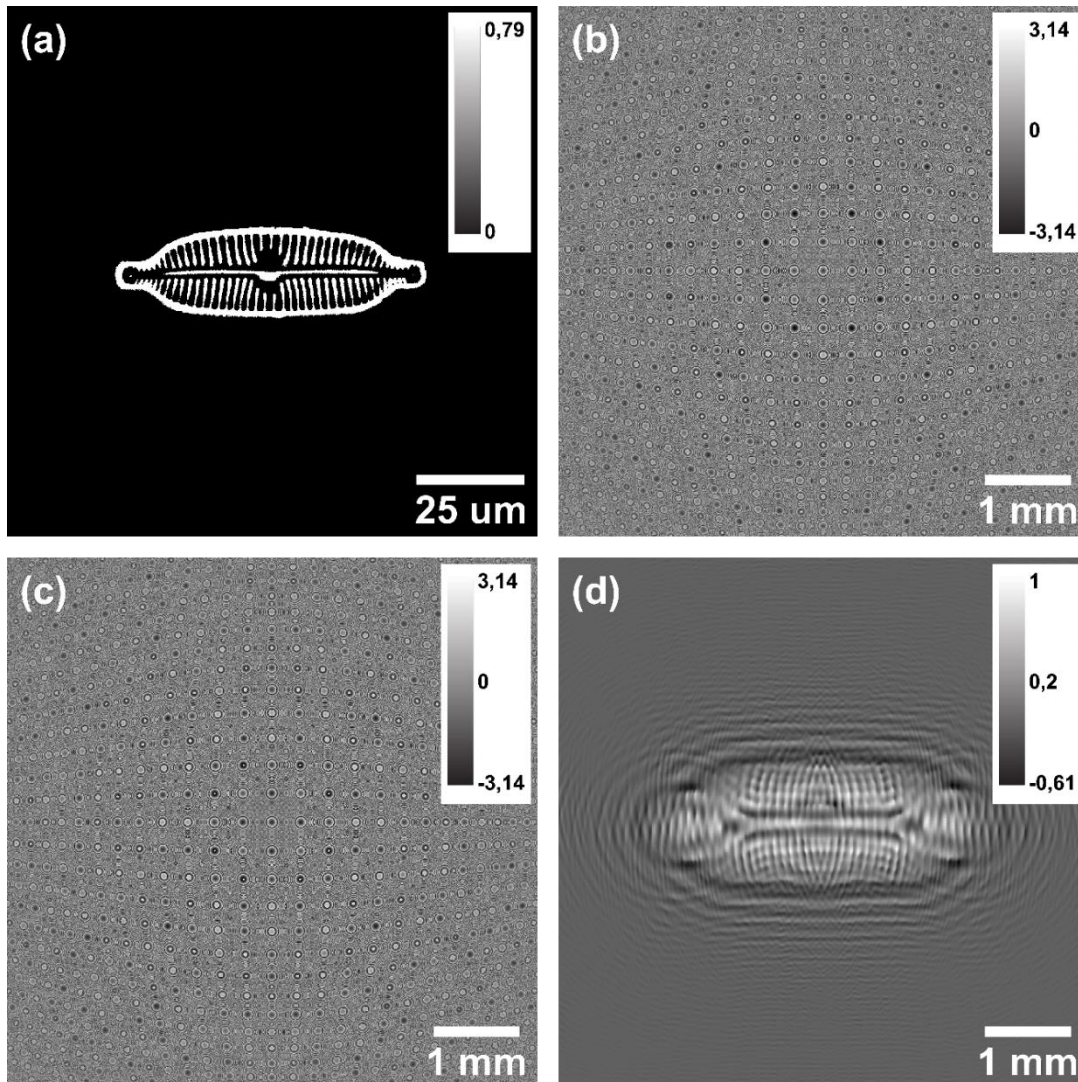
Como ya se mencionó anteriormente, este problema de muestreo no afecta el registro de los hologramas en DLHM debido a que los sensores digitales sólo registran valores de intensidad y la información de fase se pierde, debido a esto no se requiere un sensor con capacidad de registrar adecuadamente los cambios de fase. En la reconstrucción, el holograma debe ser multiplicado punto a punto por la onda compleja de referencia, en

principio esto supone un problema debido a la necesidad de muestrear correctamente este campo complejo, pero con transformadas como la de Kreuzer [44] o la de la patente UN [47], este problema se soluciona de una manera astuta al eliminar la onda de referencia de manera analítica y realizar un cambio de coordenadas para eliminar la no linealidad de los factores de fase.

Las metodologías iterativas requieren cálculos numéricos de difracción entre el plano del objeto y el plano de registro, el cálculo de difracción entre el plano de registro y el plano del objeto se puede realizar utilizando la transformada de la patente UN y el cálculo entre el plano del objeto y el plano de registro se puede realizar utilizando la aproximación de Rayleigh-Sommerfeld presentada en [95], esta última transformada causa un problema para el muestreo de la fase esférica en el plano de registro, pero este puede ser solucionado utilizando una técnica similar a la presentada en [65] y descrita en la sección 1.4. En este caso la técnica se puede describir usando los siguientes pasos:

- (a) Propagar la imagen que representa el objeto, ver Figura 3-4 (a), iluminándola con una onda de referencia esférica y obtener el campo complejo $\psi_o(\mathbf{r}')$.
- (b) Calcular la fase del campo propagado $\psi_o(\mathbf{r}')$, y obtener la distribución de fase $\phi_o(\mathbf{r}')$, ver Figura 3-4 (b).
- (c) Propagar la onda esférica de referencia y obtener el campo complejo $\psi_R(\mathbf{r}')$.
- (d) Calcular la fase del campo propagado $\psi_R(\mathbf{r}')$, y obtener la distribución de fase $\phi_R(\mathbf{r}')$, ver Figura 3-4 (c).
- (e) Realizar una resta punto a punto de las funciones $\phi_o(\mathbf{r}')$ y $\phi_R(\mathbf{r}')$.
- (f) El resultado de la resta puntual debe llevarse a módulo 2π , esto es, en los puntos que el resultado sea menor que $-\pi$ debe sumársele 2π y en los puntos donde sea mayor a π debe restársele 2π . El resultado obtenido de esta resta representa el mapa de fase con las perturbaciones compensadas, ver Figura 3-4 (d).

Figura 3-4: (a) Mapa de fase que representa el objeto. (b) Fase $\phi_o(r')$ del campo propagado con muestra. (c) Fase $\phi_R(r')$ del campo propagado sin muestra. (d) Fase obtenida después de realizar la resta módulo 2π .



El mapa de fase presentado en la Figura 3-4 (d) no presenta problemas de muestreo como los mapas de fase en los cuadros (b) y (c) de la Figura 3-4, además, este mapa de fase tiene una distribución que es de esperarse debido a la fase del objeto, presentada en la Figura 3-4 (a). Este método además de eliminar el problema de muestreo existente permite eliminar la fase de la onda de referencia, tarea que debe realizarse ya que la transformada de la patente UN incluye la onda de referencia para la propagación. Esta técnica le incrementa el nivel de complejidad del algoritmo iterativo que se planea implementar ya que debe realizarse al menos una vez en cada iteración.

3.3. Distancia de reconstrucción

Cuando se reconstruye un holograma utilizando los mismos parámetros de su registro, el campo óptico reconstruido es indistinguible del original y se obtiene a la misma distancia del holograma a la que estaba ubicado el objeto originalmente [48,109]. Dentro de los parámetros mencionados anteriormente se encuentran las características de la onda de referencia, como su longitud de onda, su forma funcional (plana, esférica, etc.) y la posición de la fuente de iluminación, también se encuentra el tamaño de pixel del sensor utilizado para el registro. En las técnicas holográficas convencionales, los cambios de posición debidos a cambios en la longitud de onda o cambios de la posición de la fuente de iluminación han sido ampliamente estudiados, por ejemplo, en la referencia [48] Goodman desarrolla un conjunto de ecuaciones para determinar el cambio de la posición de reconstrucción a partir de los cambios en la longitud de onda y la posición de la fuente de iluminación.

En DLHM el cambio de la longitud de onda o el cambio de la posición de la fuente de iluminación no se consideran como un problema, ya que al realizar la reconstrucción como un proceso numérico se pueden elegir estos parámetros a voluntad y hacerlos coincidir con los parámetros que se tenían en el proceso de registro. La diferencia en la forma funcional entre las ondas de iluminación utilizadas para el registro y la reconstrucción sí se considera un problema, en la práctica no es posible obtener una onda esférica perfecta y en los métodos de reconstrucción que se encuentran en el estado del arte, como la patente UN, la onda de referencia esférica para la reconstrucción se introduce de manera analítica removiendo la libertad de elegir la onda de iluminación a voluntad [44,47]. Por esta diferencia entre las ondas de referencia en el registro y la reconstrucción, es de esperarse que el campo óptico recuperado a partir de un holograma experimental de DLHM tenga dimensiones diferentes a las originales y que, además, se reconstruya en posiciones diferentes a las de registro.

Además de la diferencia entre las posiciones originales y las de la imagen debido a la diferencia funcional entre las ondas de referencia en el registro y la reconstrucción, en DLHM se presenta una diferencia adicional en las posiciones de reconstrucción presumiblemente debido a que los métodos de reconstrucción que se encuentran en el estado del arte, como la patente UN, son métodos aproximados [44,47]. Esta diferencia se

hace evidente cuando se trabaja con hologramas simulados, en ese caso la onda de referencia en el registro es idéntica a la onda de referencia usada en la reconstrucción, por lo cual se esperaría que las posiciones fueran idénticas también, pero esto no ocurre. Con el fin de ilustrar esta situación, se simuló un holograma de contraste analítico para un conjunto de objetos puntuales distribuidos en una espiral como la que se muestran en la Figura 3-5 (b).

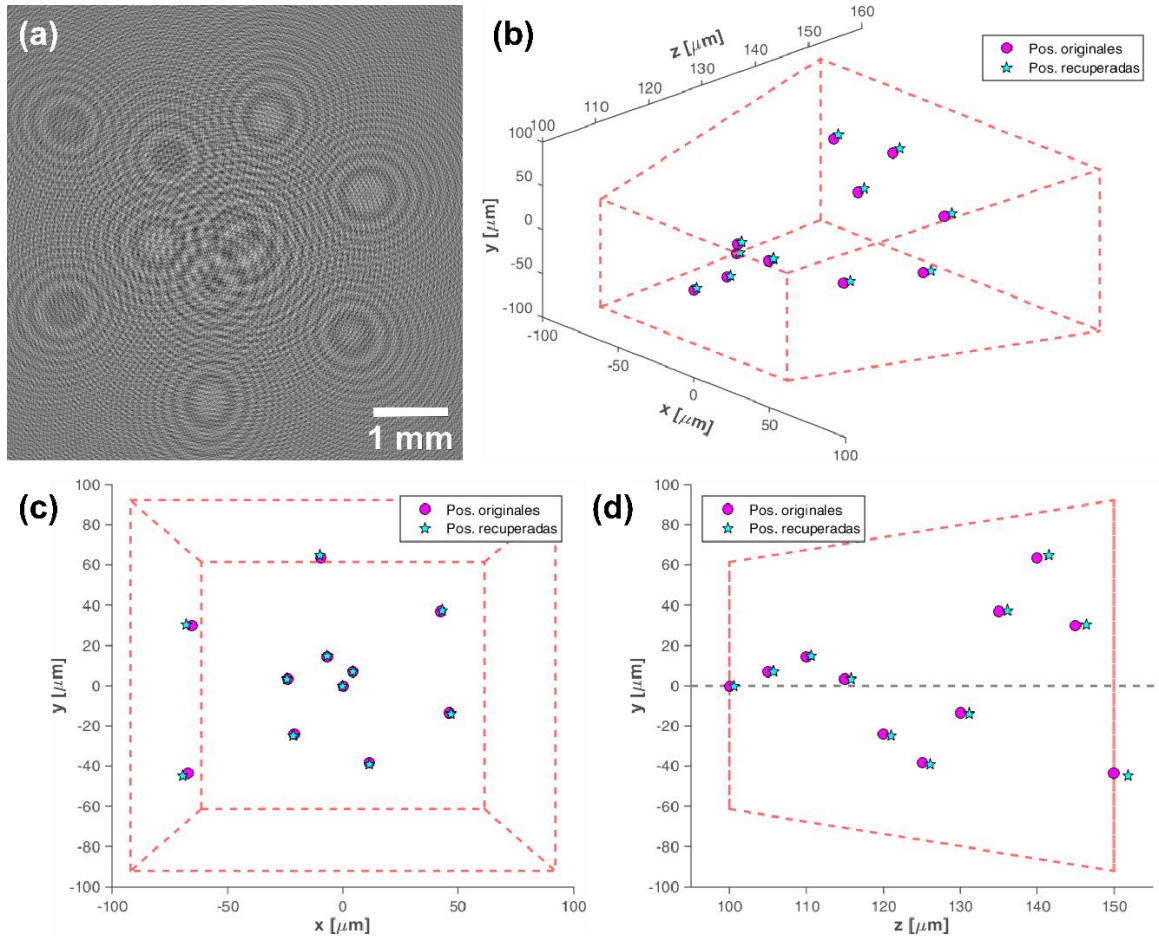
Conociendo las posiciones de los objetos puntuales se puede obtener el holograma de contraste analítico para cada uno de ellos siguiendo estos pasos

- (a) Generar la onda de referencia en el plano de registro, esta onda es esférica y es producida por una fuente puntual ubicada en la posición $(0,0,0)$.
- (b) Generar la onda del objeto en el plano de registro, esta onda también es esférica y es producida por una fuente puntual ubicada en la posición (x_o, y_o, z_o) .
- (c) Sumar ambas ondas en amplitud.
- (d) Obtener el holograma calculando la intensidad del campo complejo resultante del paso (c).
- (e) Calcular el holograma de contraste utilizando la intensidad de la onda generada en el paso (a) y el holograma obtenido en el paso (d).

Después de realizar este procedimiento para cada uno de los objetos puntuales el holograma de contraste total, ver Figura 3-5 (a), se puede obtener simplemente realizando una suma puntual de todos los hologramas de contraste obtenidos [95]. Para realizar la simulación se utilizó una longitud de onda de 405 nm, una distancia de 5 mm entre la fuente y el plano de registro, y un sensor de 1024x1024 píxeles con un tamaño de 6 μm cada uno. Estos parámetros derivan en una apertura numérica de 0,52.

Para la reconstrucción se utilizó el método presentado en la patente UN [47] y se determinó el plano de enfoque para cada partícula buscando el plano en el cual cada una tuviera su valor máximo de intensidad, esto debido a que en el plano de enfoque la energía se concentra en la menor área posible. Los resultados se presentan en los cuadros (b), (c) y (d) de la Figura 3-5, donde los círculos representan las posiciones originales de los objetos puntuales y las estrellas las posiciones reconstruidas. En la vista tridimensional se puede

Figura 3-5: Simulación para objetos puntuales distribuidos en una espiral. (a) Holograma de contraste total. (b) Vista tridimensional de las posiciones originales y de reconstrucción. (c) y (d) Vistas bidimensionales de las posiciones en los planos xy y zy . La línea punteada gris representa el eje óptico del sistema y la caja punteada roja representa el cono de proyección del medio de registro hacia la fuente de iluminación.



observar que existe una diferencia entre las posiciones originales y reconstruidas de los objetos puntuales, en este caso como las ondas de referencia de registro y reconstrucción son idénticas y además el holograma fue simulado de forma analítica, esta diferencia se debe únicamente al método de difracción utilizado en el proceso de reconstrucción. En la gráfica de la Figura 3-5 (b) se puede observar la diferencia en las posiciones laterales y en la gráfica de la Figura 3-5 (c) la diferencia en las posiciones axiales, aparentemente la diferencia entre las posiciones originales y de reconstrucción aumenta a medida que el objeto puntual está más alejado del eje óptico. Por este motivo es posible que la diferencia entre las posiciones se presente debido a las aproximaciones realizadas en la derivación

del método numérico de difracción, en general, el error de estas aproximaciones aumenta como una función de la distancia del ojo óptico [48].

Para solucionar el primer problema, debido a la diferencia entre las ondas de referencia se han desarrollado diferentes técnicas de autoenfoco como la métrica modificada de energía encerrada [110–112] que determina el plano de mejor enfoque utilizando la técnica mencionada anteriormente, es decir, buscando en cuál plano se obtiene la mayor cantidad de energía encerrada en la menor área posible y que además tiene en cuenta que la iluminación en DLHM está dada por ondas esféricas. Esta técnica en el algoritmo iterativo enfocado a DLHM podría utilizarse para reconstruir inicialmente el holograma registrado y así obtener la estimación inicial para el campo óptico del objeto. Después de esto, como ya se mencionó anteriormente, para propagar esta estimación del campo óptico del objeto hasta el plano de registro se puede utilizar la aproximación de Rayleigh-Sommerfeld presentada en [95]; esto supone un problema ya que en cada iteración la distancia de reconstrucción cambiaría, para solucionarlo, la propuesta es definir una distancia cercana a la distancia original de reconstrucción y utilizarla cada que se propague desde el plano del objeto hasta el plano de registro, de esta manera se puede asegurar que el campo estimado en el plano de registro siempre se enfoque en la misma distancia medida desde la fuente puntual, para determinar esta distancia se puede realizar una simulación con un objeto puntual y determinar el plano de enfoque como se hizo para las posiciones en la Figura 3-5 y así se tendría una misma distancia conocida para todas las iteraciones.

3.4. Propuesta de RFMI con iluminación de ondas esféricas en DLHM

Teniendo en cuenta las soluciones planteadas en este capítulo y el algoritmo de Rong presentado en el capítulo anterior, se puede presentar una propuesta para desarrollar un algoritmo iterativo que sea funcional bajo las condiciones experimentales de DLHM. Esta propuesta se puede describir en los siguientes pasos:

- (a) Reconstruir el holograma registrado con el fin de obtener una estimación inicial $g_1'(x)$ para el objeto. El plano de enfoque se puede determinar utilizando la métrica modificada de energía encerrada [110–112].

- (b) Definir una distancia z_s cercana a la de reconstrucción y utilizarla para simular el holograma de un objeto puntual ubicado a esa distancia.
- (c) Determinar la distancia de reconstrucción z_r para el objeto puntual simulado en el punto (c).
- (d) Usar metodologías de detección de bordes y el conocimiento previo del objeto, con el fin de obtener una función de soporte $S(x)$ que sirva para determinar las regiones en las que se encuentra presente el objeto. Esta función de soporte puede ser binaria, con valores de 1 en las regiones donde esté presente el objeto y de 0 en las regiones donde no esté presente.
- (e) Compensar la fase esférica de la onda de referencia presente en $g_k'(x)$ utilizando la resta módulo 2π reportada por Jericho [65].
- (f) Reemplazar por 1 los valores de $g_k'(x)$ que no se encuentren dentro de la función de soporte S . De nuevo, esta condición indica que en las regiones donde no está presente el objeto, la función de transmitancia (objeto) debe valer 1, con el fin de representar el no esparcimiento de la onda de referencia, es decir, que no se absorbe energía y que no se introduce ningún cambio de fase.
- (g) Modificar los valores que se encuentren dentro del soporte S y que no cumplan la condición de no negatividad. Las partes real e imaginaria que se encuentren dentro del soporte deben ser positivas, los valores negativos se deben a la interferencia entre la imagen gemela y la onda de referencia. Esta condición se debe aplicar en la parte real e imaginaria si el objeto es de amplitud y fase o solamente en la parte real si el objeto es de amplitud. Como en los algoritmos híbridos de entrada-salida, esta modificación se da en la siguiente forma

$$g_k(x) = \begin{cases} g_k'(x), & x \notin \gamma \\ g_{k-1}(x) - \rho g_k'(x), & x \in \gamma \end{cases} \quad (3.7)$$

donde γ representa los puntos que pertenecen a S y no cumplen la condición de no negatividad y ρ es el parámetro de relajación. Cuando $k=1$, la Ecuación (2.16) se debe reemplazar por

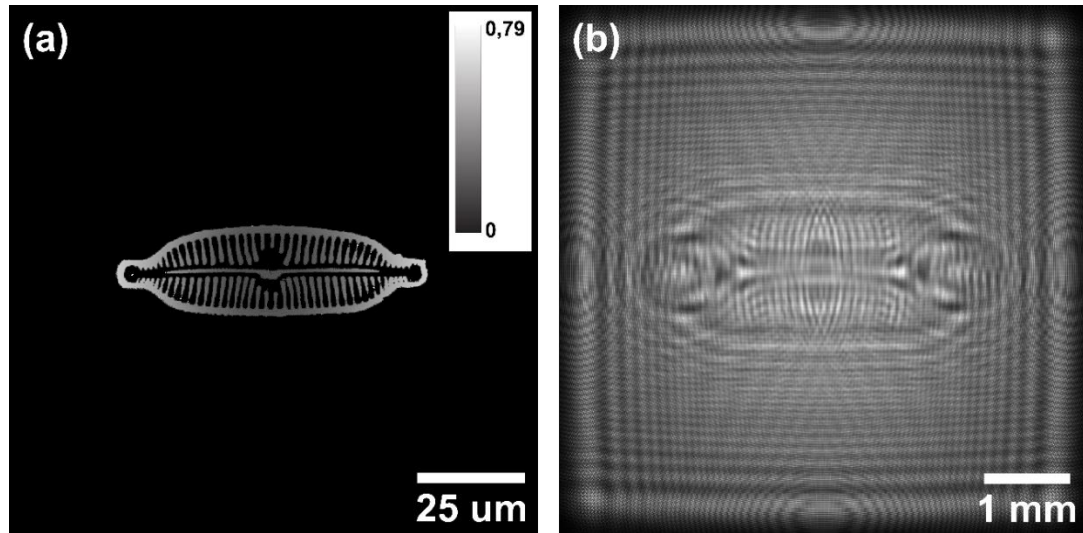
$$g_1(x) = \begin{cases} g_1'(x), & x \notin \gamma \\ g_1'(x) - \rho g_1'(x), & x \in \gamma \end{cases}$$

- (h) Propagar la nueva función estimada del objeto, $g_k(x)$, desde z_s hasta el plano del holograma.
- (i) Compensar la fase esférica mal muestreada utilizando la técnica presentada en la Sección 3.2 para obtener $G_k(u) = |G_k(u)| \exp[i\beta_k(u)]$.
- (j) Reemplazar el módulo de $G_k(u)$ por la raíz cuadrada del holograma registrado para obtener una nueva función $G'_k(u)$ estimada para el campo complejo en el plano de registro, dada por $G'_k(u) = |F(u)| \exp[i\beta_k(u)]$, donde $|F(u)|$ representa la raíz cuadrada del holograma registrado y es la condición que se impone en la magnitud plano de registro.
- (k) Propagar la nueva función estimada para el plano de registro, $G'_k(u)$, hasta z_r y eliminar la fase esférica de la onda de referencia para obtener $g'_{k+1}(x) = |g'_{k+1}(x)| \exp[i\alpha'_{k+1}(x)]$ y realimentar el algoritmo en el paso (e).

Las fases utilizadas en los pasos (e) e (i) van a ser las mismas en todas las iteraciones del algoritmo, por lo cual se pueden almacenar evitando así su cálculo en cada iteración y mejorando el tiempo de computo del algoritmo.

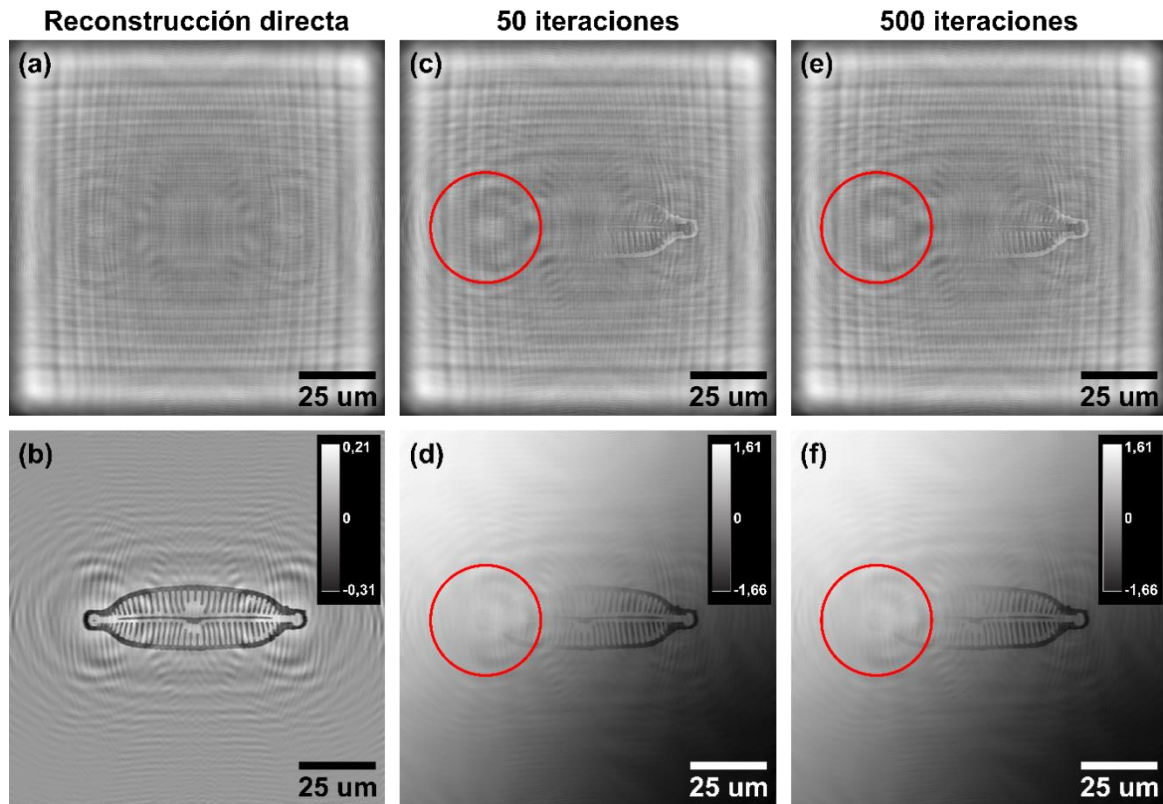
Con el fin de poner a prueba esta propuesta, se simuló un holograma a partir de un objeto puro de fase conocido como el que se presenta en la Figura 3-6 (a); por ser objeto puro de fase la amplitud está representada por valores iguales a uno en todos los puntos. La distribución de fase contiene valores entre 0 rad y $\pi/4$ rad. El objeto fue simulado utilizando una imagen de 1024x1024 píxeles con un tamaño de $0,12 \mu\text{m}$ cada uno y para obtener el holograma se utilizó una longitud de onda de 405 nm, una distancia entre la fuente y el objeto de $100 \mu\text{m}$, una distancia entre la fuente y el plano de registro de 5 mm y un sensor de 1024x1024 píxeles con un tamaño de $6 \mu\text{m}$ cada uno. El holograma obtenido se presenta en la Figura 3-6 (b) y fue usado como la entrada del algoritmo.

Figura 3-6: Simulación del proceso de registro de un holograma en DLHM con un objeto puro de fase. (a) Fase del objeto. (b) Holograma simulado.



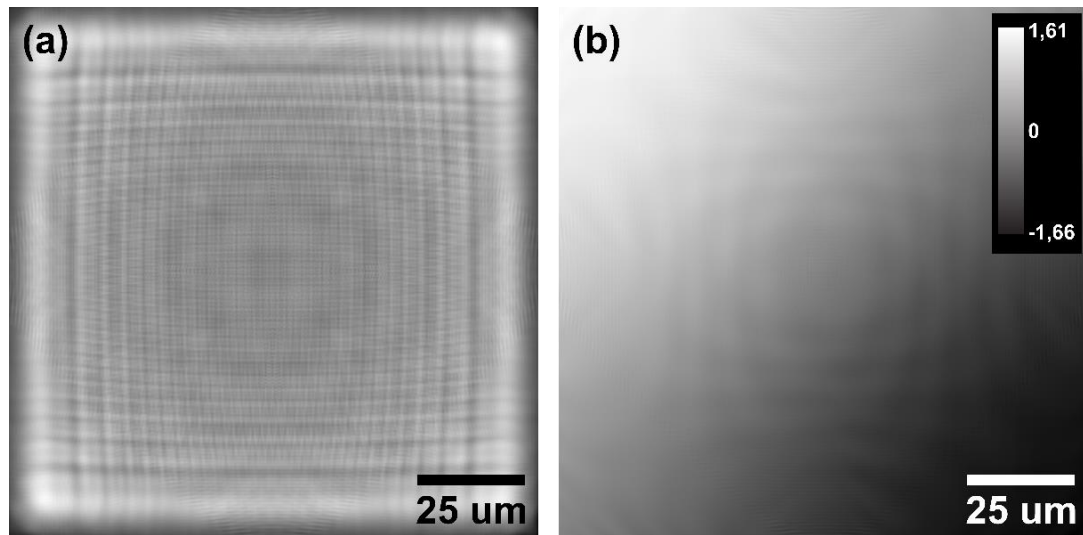
En la Figura 3-7 se presentan los resultados obtenidos en amplitud y fase por reconstrucción directa y después de correr el algoritmo durante 50 y 500 iteraciones. El algoritmo se corrió utilizando una máscara binaria que coincide exactamente con la distribución del objeto y un parámetro de relajación $\rho = 0,1$, de acuerdo con los resultados obtenidos en la sección 2.3. En la reconstrucción directa en amplitud se pueden observar unas franjas verticales y horizontales que no estaban presentes en la imagen original y en fase se puede observar que está presente la imagen gemela, además el rango de valores de la fase difiere mucho del rango original. Después de 50 iteraciones las franjas en amplitud siguen presentes y en fase se alcanza a distinguir la imagen gemela, pero esta obscurecida debido a la aparición de dos elementos, una fase similar a una portadora a 45° desde la esquina inferior derecha hasta la esquina superior derecha y un incremento de los valores de fase que están encerrados en el círculo rojo, además de esto, el rango de valores que comprende la fase recuperada sigue distando mucho de los valores originales. Después de 500 iteraciones los resultados obtenidos son los mismos que a 50 iteraciones, lo cual indica que el algoritmo sufre de problemas de estancamiento.

Figura 3-7: Resultados obtenidos con el algoritmo iterativo propuesto para DLHM. (a), (c) y (e) Imágenes de amplitud. (b), (d) y (f) Imágenes de fase.



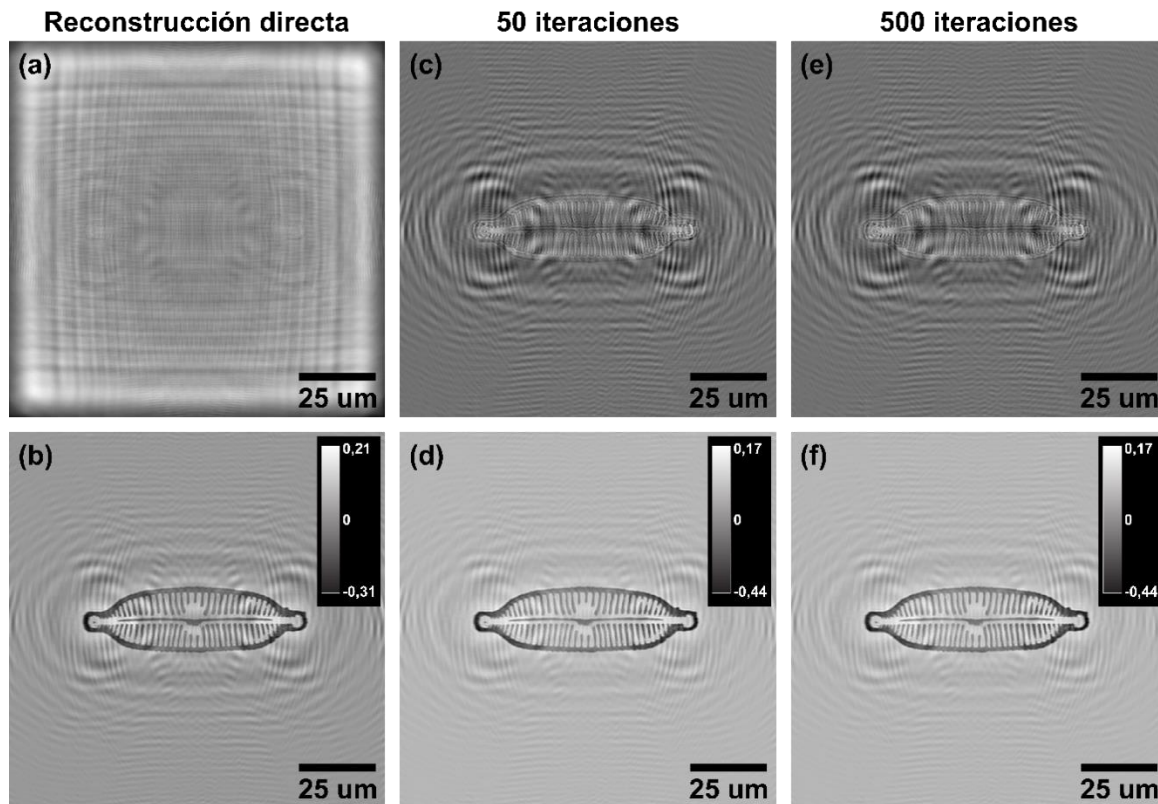
Cuando el algoritmo se corre utilizando como entrada la intensidad de la onda de referencia en el plano de registro, se obtienen las imágenes de amplitud y fase que se presentan en la Figura 3-8. Para obtener estas imágenes el algoritmo se corrió sin máscara, es decir, que el “objeto” ocupa todo el campo de visión, por lo cual la condición en el paso (f) del algoritmo aplica para todos los puntos y el paso (g) es eliminado de la ejecución. En amplitud se pueden ver las franjas verticales y horizontales que aparecen las amplitudes de la Figura 3-7 y en fase se puede observar la distribución similar a una portadora a 45° que aparece en los cuadros (d) y (f) de la Figura 3-7. Debido a esto y con el fin de eliminar información no deseada de las imágenes recuperadas por el algoritmo en cada iteración, se puede correr dentro del mismo ciclo el algoritmo para el holograma y la intensidad de su onda de referencia y en cada iteración realizar una resta convencional en amplitud y una resta de módulo 2π en la fase y realimentar el algoritmo con el campo complejo resultante de estas restas.

Figura 3-8: Resultados obtenidos después de 50 iteraciones usando como entrada la intensidad de la onda de referencia. (a) Amplitud. (b) Fase.



Después de realizar estos cambios y correr el algoritmo usando el holograma y la intensidad de su onda de referencia, se obtienen los resultados presentados en la Figura 3-9. En estas imágenes ya no está presente la información no deseada, en amplitud las franjas verticales y horizontales ya no aparecen y en fase, ahora no están ni la portadora a 45° ni el incremento de los valores de fase encerrado en los círculos rojos de la Figura 3-7. A pesar de haber eliminado esta información no deseada, la imagen gemela sigue presente a través de la ejecución del algoritmo y se puede observar tanto en amplitud como en fase en las columnas correspondientes a 50 y 500 iteraciones. Además de esto, en amplitud se debería recuperar una imagen plana porque el objeto es puramente de fase, pero lo que se recupera es una imagen del objeto perturbada por la imagen gemela. En fase se observa algo similar, la imagen del objeto perturbada por la imagen gemela, pero con un rango de valores más amplio y aparentemente con menor influencia de la imagen gemela. Por último, también se puede observar que el algoritmo sigue sufriendo de problemas de estancamiento, los resultados obtenidos al transcurrir 500 iteraciones son los mismos que se obtienen después de 50.

Figura 3-9: Resultados obtenidos con la propuesta modificada para el algoritmo iterativo de recuperación de fase en DLHM. (a), (c) y (e) Imágenes de amplitud. (b), (d) y (f) Imágenes de fase.



3.5. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos para el algoritmo iterativo de recuperación de fase en DLHM ameritan la continuación de la investigación puesto que la información recuperada aún dista de la información introducida en el proceso de simulación-recuperación. Esto puede deberse a los problemas de estancamiento y la aparición de las franjas en la amplitud y la “portadora” en la fase. Identificar la naturaleza del estancamiento del algoritmo es una labor complicada debido a la complejidad numérica del algoritmo implementado. La aparición de las franjas y la portadora puede deberse a un problema numérico relacionado directamente con los métodos de difracción utilizados, esto debido a que las franjas y la portadora aparecen en los resultados de cada iteración a pesar de compensarlos en los resultados de la iteración anterior que realimentan el algoritmo.

Para profundizar en el problema de las franjas y la portadora, se puede observar el resultado obtenido al propagar una imagen plana, con un valor constante para todos sus píxeles, en este caso ese valor puede ser igual a 1. En la Figura 3-10 se muestran los resultados obtenidos en amplitud y fase cuando se utilizan los 3 métodos de difracción aplicables a DLHM. En la primera columna, se presentan los resultados obtenidos con la aproximación de Rayleigh-Sommerfeld [95] utilizada para propagar desde el plano del objeto hasta el plano de registro, en este caso el resultado esperado es una imagen plana en amplitud y una en fase, pero como se puede observar lo que se obtiene es un conjunto de franjas tanto en amplitud como en fase. En la segunda columna, se presentan los resultados obtenidos al utilizar el método presentado en la patente UN [47] para la reconstrucción de hologramas de DLHM, como este método incluye de forma analítica una onda esférica como iluminación el resultado esperado es un par de imágenes que representen una onda esférica, la imagen obtenida en fase representa la fase de una onda esférica, pero en amplitud de nuevo se obtienen franjas que no representan la amplitud de una onda esférica. Por último, en la tercera columna se pueden observar los resultados obtenidos con Fresnel-Bluestein [83], de nuevo el resultado esperado son imágenes planas en amplitud y fase, pero lo que se obtiene son franjas que no representan una onda plana. Para la aproximación de Rayleigh-Sommerfeld y Fresnel-Bluestein el tamaño de los campos de entrada y salida es el mismo.

El problema se hace más evidente cuando se realiza el mismo procedimiento utilizando los métodos clásicos de difracción como convolución [113], espectro angular [79,80], Fresnel (convolución) [48,81] y Fresnel (Fourier) [82]. En la Figura 3-11 se presentan los resultados obtenidos para los cuatro métodos de difracción mencionados, para cada uno de los cuatro métodos el resultado esperado es un par de imágenes planas para amplitud y fase. En los resultados de la Figura 3-11 se puede observar que cuando se utilizan los métodos de convolución, espectro angular y Fresnel (convolución) se obtienen las imágenes planas esperadas y que sí representan una onda plana. En el caso de Fresnel (Fourier) el resultado obtenido de nuevo está perturbado por las franjas en amplitud y en fase, además, en fase aparece algo similar a la “portadora” que se obtiene cuando se implementa el algoritmo iterativo para DLHM.

Figura 3-10: Resultados obtenidos al propagar una imagen compuesta por valores iguales a 1 en todos los puntos utilizando los métodos de difracción utilizados en DLHM.

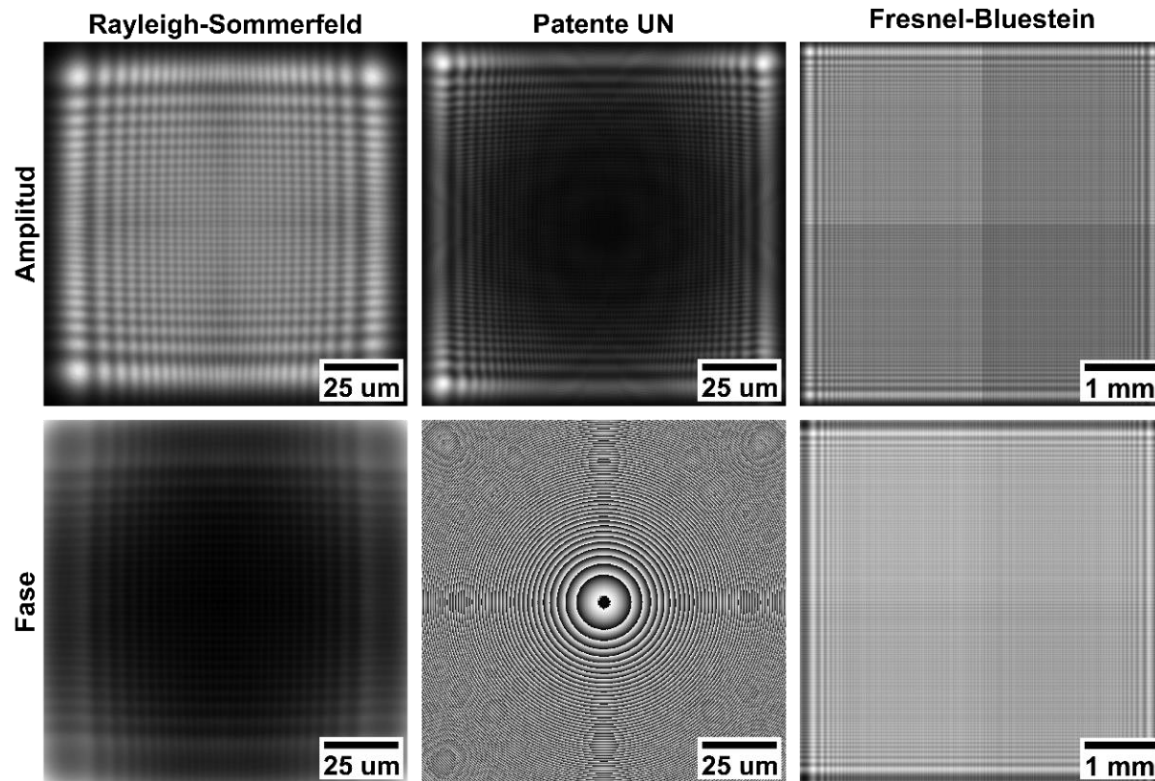
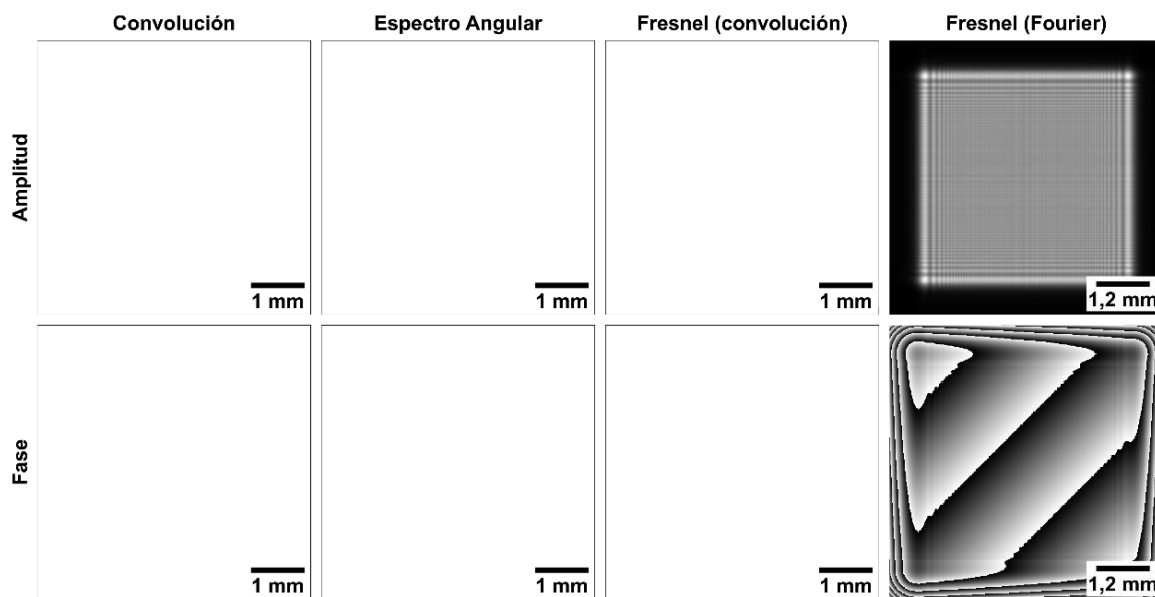


Figura 3-11: Resultados obtenidos al propagar una imagen compuesta por valores iguales a 1 en todos los puntos utilizando diferentes métodos numéricos de difracción clásicos.



En este caso, y en general cuando se trabaja con difracción numérica, las funciones (imágenes) que se usan como entradas son funciones de soporte compacto y las franjas que aparecen representan la difracción de la ventana que determina el soporte. La pregunta de interés en este caso es ¿Por qué las franjas aparecen cuando se utilizan ciertos métodos numéricos de difracción? Darle respuesta a esta pregunta es complejo y está por fuera del alcance de esta tesis de maestría, lo que sí se puede hacer es establecer diferencias y similitudes entre los métodos utilizados. Los métodos que dan como resultado imágenes planas son los métodos que se calculan como convoluciones y parten de analizar la difracción como un sistema lineal con una función de respuesta al impulso $h(x, y)$ que varía según la metodología, además, son los métodos que exigen que las ventanas de entrada y salida tengan el mismo tamaño. De los métodos que entregan resultados perturbados por las franjas, tres se calculan como convoluciones y uno como una transformada de Fourier, las tres metodologías que se calculan como convoluciones le permiten al usuario escoger a voluntad el tamaño de la ventana de salida y aunque en este caso las ventanas de entrada y salida tenían el mismo tamaño los resultados obtenidos no fueron los esperados.

Por último, vale la pena mencionar que las metodologías iterativas de recuperación de fase reportadas en la literatura, hasta el momento, utilizan los métodos numéricos de difracción que en la prueba anterior permitieron obtener los resultados esperados y que además de esto, a diferencia de la propuesta planteada en este trabajo son metodologías que utilizan el mismo método numérico para realizar la propagación en ambos sentidos. Por ejemplo el algoritmo de Rong [63] en el artículo original utiliza Fresnel (convolución) y en la sección 2.3 de este trabajo fue implementado utilizando espectro angular, el algoritmo de Koren [60,61] utiliza el método de convolución y las metodologías presentadas por Fink [62,64] utilizan espectro angular. Si bien esto no es algo concluyente y que permita descartar las metodologías que producen franjas para su uso en técnicas iterativas de recuperación de fase, sí indica que es un problema que merece ser estudiado a mayor profundidad.

4. Conclusiones y perspectivas

4.1. Conclusiones

En esta tesis de maestría en Ciencias – Física se estudiaron diferentes factores que influyen en la implementación de metodologías de recuperación de fase a partir de mediciones de intensidad en microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM). Se demostró que el muestreo adecuado de las ondas esféricas en el plano de registro es una labor compleja y que tecnológicamente estamos muy lejos de poder realizarla, esto debido a los tamaños de pixel requeridos y la cantidad de datos que sería necesario procesar asumiendo que se puedan fabricar sensores con dichos tamaños de pixel. También se demostró que las metodologías de difracción numérica comúnmente utilizadas en el proceso de reconstrucción en DLHM, incluyen un error numérico y debido a esto se presenta una diferencia entre las posiciones originales de los objetos y sus posiciones de reconstrucción. Para estos dos problemas se proponen soluciones claras y computacionalmente sencillas con el fin de minimizar su influencia en la implementación de una metodología iterativa de recuperación de fase en DLHM.

La propuesta realizada para el algoritmo iterativo de recuperación de fase en esta tesis de maestría en Ciencias – Física, sufre de problemas de estancamiento y, además, las imágenes que se obtienen en cada iteración están perturbadas por información no deseada representada en un sistema de franjas residuales. Presumiblemente, estos problemas aparecen debido a la forma en que se realizan los cálculos numéricos de difracción en DLHM, en la sección final de este texto se da inicio a esta discusión, pero para identificar la causa real de este problema, se requiere un estudio a mayor profundidad. En este trabajo se delimitaron en la mejor manera posible los problemas que se encuentran cuando se aplica una metodología iterativa de recuperación de fase a DLHM, por lo cual se establece una base sólida para futuros desarrollos.

Los algoritmos iterativos de recuperación de fase a partir de mediciones de intensidad, como muchos otros problemas de procesamiento de imágenes, dependen en gran manera de las condiciones iniciales y de los parámetros de ejecución, los cuales en la tecnología de DLHM son más exigentes que en otras técnicas de formación de imágenes. Además, son problemas que no tienen una solución única, por ejemplo, en los algoritmos que no utilizan función de soporte cuando se toma como estimación inicial para la fase una distribución aleatoria, el resultado que se obtiene también es una distribución aleatoria que cuando se propaga reproduce de manera adecuada el holograma registrado. Aun cuando se usa una estimación inicial adecuada, los valores de fase que se recuperan no son absolutos sino relativos a las condiciones fijadas para el campo complejo en el plano del objeto. En el algoritmo de Rong, se estudió la influencia del parámetro de relajación y el tamaño de la función de soporte en el algoritmo de Rong, el parámetro de relajación sólo es importante cuando se trabaja con objetos que introducen cambios de fase superiores a $3\pi/4$ rad; en estos casos es preferible trabajar con un parámetro de relajación cercano a 0,1 con el fin de introducir los cambios de manera suave. La función de soporte es un factor crítico para poder obtener un buen resultado sin importar las características del objeto, esto hace que el algoritmo dependa en gran medida de las técnicas utilizadas para generar la función de soporte de manera automática a partir de la reconstrucción directa de los hologramas.

DLHM es una técnica con gran potencial para desarrollar un instrumento portátil y de bajo costo que permita el estudio de muestras transparentes en campo sin necesidad de montajes elaborados y entornos controlados. A pesar de esto, DLHM al ser una técnica de dos pasos e intercambiar la complejidad experimental por complejidad computacional en su etapa de reconstrucción, tiene problemas complejos en la etapa de procesamiento digital que deben ser solucionados antes de convertirla en una tecnología competitiva para su uso en diferentes campos de ciencia y tecnología, cuando el interés primario es el análisis de muestras de fase.

En el proceso de investigación para el desarrollo de una técnica de recuperación de fase en DLHM a partir de mediciones de intensidad, se elaboraron diversas herramientas computacionales para trabajar con difracción numérica de campos escalares, como es el caso de la librería científica *JDiffraction*, que funciona bajo programación en serie (CPU) o paralela (GPU), y los plugins para ImageJ *Numerical Wave Propagation*, con registro

número 13-50-214 ante el Ministerio del Interior de Colombia, y *Digital Lensless Holographic Microscopy*, con registro en trámite ante el mismo Ministerio. También se implementó un plugin funcional para trabajar desde ImageJ con las cámaras de la familia DCx de Thorlabs. Estos desarrollos fueron consignados en artículos en revistas de circulación internacional.

4.2. Perspectivas

Teniendo como base el algoritmo elaborado en este trabajo, se puede continuar el desarrollo de una técnica que solucione los problemas estudiados en esta tesis. Por ejemplo, para solucionar los problemas de estancamiento los cambios que se introducen en la función estimada para el objeto se pueden realizar utilizando otras variantes de los algoritmos de entrada-salida. También es importante estudiar los problemas numéricos relacionados con los métodos de difracción utilizados en este trabajo, a futuro esto es importante porque la aparición de las franjas residuales incrementa la complejidad del algoritmo necesitando dos propagaciones adicionales en cada iteración para poder compensarlas. Además, cuando se solucionen estos problemas se podría determinar si tenían influencia o no sobre los problemas de estancamiento que posee la propuesta realizada para el algoritmo iterativo de recuperación de fase en DLHM. De ser posible, también sería interesante intentar derivar una nueva metodología numérica de difracción que sea aplicable a DLHM cumpliendo sus requisitos experimentales y que además sirva para realizar las propagaciones en ambos sentidos.

En las etapas de desarrollo del algoritmo iterativo de recuperación de fase la complejidad computacional y el tiempo de cómputo requerido no han sido prioridades en esta tesis. Pero cuando se cuente con una versión funcional del algoritmo, que no presente los problemas expuestos en esta tesis de Maestría en Ciencias - Física, se debe realizar una implementación del mismo utilizando programación paralela de GPUs NVIDIA usando CUDA. La motivación para realizar esta implementación es que permite reducir los tiempos de cómputo como mínimo a un cuarto del tiempo inicial. Debido a la amplia experiencia y trayectoria de nuestro grupo de investigación en programación de GPUs NVIDIA, realizar esta implementación sería una tarea sencilla y que mejoraría en gran manera la experiencia del usuario final de DLHM como una tecnología para realizar mediciones cuantitativas de fase.

Bibliografía

1. G. Popescu, *Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues* (McGraw Hill Professional, 2011).
2. E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms," *Appl. Opt.* **38**, 6994–7001 (1999).
3. P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb, and C. Depeursinge, "Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy," *Opt. Lett.* **30**, 468–470 (2005).
4. B. Bhaduri, C. Edwards, H. Pham, R. Zhou, T. H. Nguyen, L. L. Goddard, and G. Popescu, "Diffraction phase microscopy: principles and applications in materials and life sciences," *Adv. Opt. Photonics* **6**, 57–119 (2014).
5. B. Kemper, D. Carl, J. Schnekenburger, I. Bredebusch, M. Schäfer, W. Domschke, and G. von Bally, "Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy," *J. Biomed. Opt.* **11**, 34005–34008 (2006).
6. N. Pavillon, J. Kühn, C. Moratal, P. Jourdain, C. Depeursinge, P. J. Magistretti, and P. Marquet, "Early Cell Death Detection with Digital Holographic Microscopy," *PLoS One* **7**, e30912 (2012).
7. J. Kühn, E. Shaffer, J. Mena, B. Breton, J. Parent, B. Rappaz, M. Chambon, Y. Emery, P. Magistretti, C. Depeursinge, P. Marquet, and G. Turcatti, "Label-Free Cytotoxicity Screening Assay by Digital Holographic Microscopy," *Assay Drug Dev. Technol.* **11**, 101–107 (2012).
8. M. Puthia, P. Storm, A. Nadeem, S. Hsiung, and C. Svanborg, "Prevention and treatment of colon cancer by peroral administration of HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumour cells)," *Gut* **63**, 131–142 (2014).
9. Y. Park, G. Popescu, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Fresnel particle

- tracing in three dimensions using diffraction phase microscopy," *Opt. Lett.* **32**, 811–813 (2007).
10. H. Sun, B. Song, H. Dong, B. Reid, M. A. Player, J. Watson, and M. Zhao, "Visualization of fast-moving cells in vivo using digital holographic video microscopy," *J. Biomed. Opt.* **13**, 14007–14009 (2008).
 11. J. Kühn, F. Montfort, T. Colomb, B. Rappaz, C. Moratal, N. Pavillon, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Submicrometer tomography of cells by multiple-wavelength digital holographic microscopy in reflection," *Opt. Lett.* **34**, 653–655 (2009).
 12. B. Kemper, A. Bauwens, A. Vollmer, S. Ketelhut, P. Langehanenberg, J. Müthing, H. Karch, and G. von Bally, "Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy," *J. Biomed. Opt.* **15**, 36006–36009 (2010).
 13. J. F. Restrepo and J. Garcia-Sucerquia, "Automatic three-dimensional tracking of particles with high-numerical-aperture digital lensless holographic microscopy," *Opt. Lett.* **37**, 752–754 (2012).
 14. G. A. Dunn, D. Zicha, and P. E. Fraylich, "Rapid, microtubule-dependent fluctuations of the cell margin," *J. Cell Sci.* **110**, 3091 LP-3098 (1997).
 15. G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics," *Opt. Lett.* **31**, 775–777 (2006).
 16. B. Joshi, I. Barman, N. C. Dingari, N. Cardenas, J. S. Soares, R. R. Dasari, and S. Mohanty, "Label-free route to rapid, nanoscale characterization of cellular structure and dynamics through opaque media," *Sci. Rep.* **3**, 2822 (2013).
 17. H. Majeed, M. E. Kandel, K. Han, Z. Luo, V. Macias, K. V Tangella, A. Balla, and G. Popescu, "Breast cancer diagnosis using spatial light interference microscopy," **20**, 111210–111216 (2015).
 18. S. Sridharan, V. Macias, K. Tangella, A. Kajdacsy-Balla, and G. Popescu, "Prediction of Prostate Cancer Recurrence Using Quantitative Phase Imaging," *Sci. Rep.* **5**, 9976 (2015).
 19. H. Majeed, S. Sridharan, M. Mir, L. Ma, E. Min, W. Jung, and G. Popescu, "Quantitative phase imaging for medical diagnosis," *J. Biophotonics* **10**, 177–205 (2017).
 20. G. Popescu, T. Ikeda, C. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy," **10**, 60503 (2005).

21. Y. Park, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M. S. Feld, T. Kuriabova, M. L. Henle, A. J. Levine, and G. Popescu, "Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 6731–6736 (2010).
22. R. Wang, H. Ding, M. Mir, K. Tangella, and G. Popescu, "Effective 3D viscoelasticity of red blood cells measured by diffraction phase microscopy," *Biomed. Opt. Express* **2**, 485–490 (2011).
23. H. V Pham, B. Bhaduri, K. Tangella, C. Best-Popescu, and G. Popescu, "Real Time Blood Testing Using Quantitative Phase Imaging," *PLoS One* **8**, e55676 (2013).
24. B. Rappaz, P. Marquet, E. CuChe, Y. Emery, C. Depeursinge, and P. J. Magistretti, "Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy," *Opt. Express* **13**, 9361–9373 (2005).
25. F. Charrière, A. Marian, F. Montfort, J. Kuehn, T. Colomb, E. CuChe, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy," *Opt. Lett.* **31**, 178–180 (2006).
26. Y. Park, M. Diez-Silva, G. Popescu, G. Lykotrafitis, W. Choi, M. S. Feld, and S. Suresh, "Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 13730–13735 (2008).
27. Y.-C. L. and C.-J. Cheng, "Determining the refractive index profile of micro-optical elements using transfective digital holographic microscopy," *J. Opt.* **12**, 115402 (2010).
28. P. Ferraro, G. Coppola, S. De Nicola, A. Finizio, S. Grilli, M. Iodice, C. Magro, and G. Pierattini, "Digital holography for characterization and testing of MEMS structures," in *Optical MEMs, 2002. Conference Digest. 2002 IEEE/LEOS International Conference on* (2002), pp. 125–126.
29. G. C. and P. F. and M. I. and S. D. N. and A. F. and S. Grilli, "A digital holographic microscope for complete characterization of microelectromechanical systems," *Meas. Sci. Technol.* **15**, 529 (2004).
30. F. Charrière, J. Kühn, T. Colomb, F. Montfort, E. CuChe, Y. Emery, K. Weible, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Characterization of microlenses by digital holographic microscopy," *Appl. Opt.* **45**, 829–835 (2006).
31. E. J. McDowell, A. K. Ellerbee, M. A. Choma, B. E. Applegate, and J. A. Izatt, "Spectral domain phase microscopy for local measurements of cytoskeletal rheology in single cells," **12**, 44008–44011 (2007).

32. C. Edwards, A. Arbabi, G. Popescu, and L. L. Goddard, "Optically monitoring and controlling nanoscale topography during semiconductor etching," *Light Sci. & Appl.* **1**, e30 (2012).
33. R. Zhou, C. Edwards, A. Arbabi, G. Popescu, and L. L. Goddard, "Detecting 20 nm Wide Defects in Large Area Nanopatterns Using Optical Interferometric Microscopy," *Nano Lett.* **13**, 3716–3721 (2013).
34. T. Kim, R. Zhou, L. L. Goddard, and G. Popescu, "Breakthroughs in Photonics 2013: Quantitative Phase Imaging: Metrology Meets Biology," *IEEE Photonics J.* **6**, 1–9 (2014).
35. W. S. Rockward, A. L. Thomas, B. Zhao, and C. A. DiMarzio, "Quantitative phase measurements using optical quadrature microscopy," *Appl. Opt.* **47**, 1684–1696 (2008).
36. W. C. Warger and C. A. DiMarzio, "Computational signal-to-noise ratio analysis for optical quadrature microscopy," *Opt. Express* **17**, 2400–2422 (2009).
37. G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan, K. Badizadegan, H. Iwai, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics," *Opt. Lett.* **29**, 2503–2505 (2004).
38. N. Lue, W. Choi, G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, K. Badizadegan, and M. S. Feld, "Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy," *Appl. Opt.* **46**, 1836–1842 (2007).
39. Z. Wang, L. Millet, M. Mir, H. Ding, S. Unarunotai, J. Rogers, M. U. Gillette, and G. Popescu, "Spatial light interference microscopy (SLIM)," *Opt. Express* **19**, 1016–1026 (2011).
40. S. D. Babacan, Z. Wang, M. Do, and G. Popescu, "Cell imaging beyond the diffraction limit using sparse deconvolution spatial light interference microscopy," *Biomed. Opt. Express* **2**, 1815–1827 (2011).
41. Z. Wang, D. L. Marks, P. S. Carney, L. J. Millet, M. U. Gillette, A. Mihi, P. V Braun, Z. Shen, S. G. Prasanth, and G. Popescu, "Spatial light interference tomography (SLIT)," *Opt. Express* **19**, 19907–19918 (2011).
42. E. Cuche, F. Bevilacqua, and C. Depeursinge, "Digital holography for quantitative phase-contrast imaging," *Opt. Lett.* **24**, 291–293 (1999).
43. H. J. Kreuzer and et al., "Digital in-line holography with photons and electrons," *J. Phys.-Condens. Mat* (2001).
44. H. J. Kreuzer, "Holographic microscope and method of hologram reconstruction,"

- U.S. patent US 6,411,406 B1 (2002).
45. J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, P. Klages, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy," (2006).
 46. M. H. Jericho and H. J. Kreuzer, "Point Source Digital In-line Holographic Microscopy," in *Coherent Light Microscopy*, P. Ferraro, A. Wax, and Z. Zalevsky, eds. (2011), pp. 3–30.
 47. J. Garcia-Sucerquia, C. Trujillo, and J. Restrepo Agudelo, "Microscopio holográfico digital sin lentes (MHDSL) y método para visualizar muestras," Colombia: SIC (Colombia). (2014).
 48. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics* (Mac. Graw-Hill, 2005).
 49. E. N. Leith and J. Upatnieks, "Reconstructed Wavefronts and Communication Theory," *J. Opt. Soc. Am.* **52**, 1123–1128 (1962).
 50. E. N. Leith and J. Upatnieks, "Wavefront Reconstruction with Continuous-Tone Objects," *J. Opt. Soc. Am.* **53**, 1377–1381 (1963).
 51. E. N. Leith and J. Upatnieks, "Wavefront Reconstruction with Diffused Illumination and Three-Dimensional Objects," *J. Opt. Soc. Am.* **54**, 1295–1301 (1964).
 52. E. CuChe, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography," **39**, 4070–4075 (2000).
 53. P. Guo and A. J. Devaney, "Digital microscopy using phase-shifting digital holography with two reference waves.," *Opt. Lett.* **29**, 857–859 (2004).
 54. I. Yamaguchi and T. Zhang, "Phase-shifting digital holography," *Springer Ser. Opt. Sci.* **162**, 95–108 (2011).
 55. T. Tahara, Y. Shimozato, Y. Awatsuji, K. Nishio, S. Ura, O. Matoba, and T. Kubota, "Spatial-carrier phase-shifting digital holography utilizing spatial frequency analysis for the correction of the phase-shift error.," *Opt. Lett.* **37**, 148–50 (2012).
 56. R. Gerchberg and W. O. Saxton, "A Practical Algorithm for the Determination of Phase from Image and Diffraction Plane Pictures," *Optik (Stuttg.)* **35**, 237–246 (1972).
 57. W. O. Saxton, *Computer Techniques for Image Processing in Electron Microscopy* (Academic Press, 1978).
 58. J. R. Fienup, "Phase retrieval algorithms: a comparison," *Appl. Opt.* **21**, 2758–2769 (1982).
 59. J. R. Fienup, "Phase retrieval algorithms: a personal tour [Invited]," *Appl. Opt.* **52**, 45–56 (2013).

60. G. Koren, D. Joyeux, and F. Polack, "Twin-image elimination in in-line holography of finite-support complex objects.," *Opt. Lett.* **16**, 1979–1981 (1991).
61. G. Koren, F. Polack, and D. Joyeux, "Iterative algorithms for twin-image elimination in in-line holography using finite-support constraints," *J. Opt. Soc. Am. A* **10**, 423–433 (1993).
62. T. Latychevskaia and H.-W. Fink, "Solution to the Twin Image Problem in Holography," *Phys. Rev. Lett.* **98**, 233901 (2007).
63. L. Rong, Y. Li, S. Liu, W. Xiao, F. Pan, and D. Wang, "Iterative solution to twin image problem in in-line digital holography," *Opt. Lasers Eng.* **51**, 553–559 (2013).
64. T. Latychevskaia and H.-W. Fink, "Reconstruction of purely absorbing , absorbing and phase-shifting , and strong phase-shifting objects from their single-shot in-line holograms," *Appl. Opt.* **54**, 3925–3932 (2015).
65. M. H. Jericho, H. J. Kreuzer, M. Kanka, and R. Riesenber, "Quantitative phase and refractive index measurements with point-source digital in-line holographic microscopy," *Appl. Opt.* **51**, 1503–1515 (2012).
66. J. . Tiller, A. Barty, D. Paganin, and K. . Nugent, "The holographic twin image problem: a deterministic phase solution," *Opt. Commun.* **183**, 7–14 (2000).
67. M. Guizar-Sicairos and J. R. Fienup, "Understanding the twin-image problem in phase retrieval," *J. Opt. Soc. Am. A* **29**, 2367 (2012).
68. P. Bao, G. Situ, G. Pedrini, and W. Osten, "Lensless phase microscopy using phase retrieval with multiple illumination wavelengths," *Appl. Opt.* **51**, 5486 (2012).
69. R. Castañeda, P. Piedrahita-Quintero, and J. Garcia-Sucerquia, "Image processing and computing for digital holography with ImageJ," *Opt. Pura y Apl.* **48**, 77–84 (2015).
70. P. Piedrahita-Quintero, R. Castañeda, and J. Garcia-Sucerquia, "Numerical wave propagation in ImageJ," *Appl. Opt.* **54**, 6410 (2015).
71. C. Trujillo, R. Castañeda, P. Piedrahita-Quintero, and J. Garcia-Sucerquia, "Automatic full compensation of quantitative phase imaging in off-axis digital holographic microscopy," *Appl. Opt.* **55**, 10299–10306 (2016).
72. P. Piedrahita-Quintero, C. Trujillo, and J. Garcia-Sucerquia, "JDiffract: A GPGPU-accelerated JAVA library for numerical propagation of scalar wave fields," *Comput. Phys. Commun.* **214**, (2017).
73. P. Piedrahita-Quintero and J. Garcia-Sucerquia, "Off-axis digital holography simulation in ImageJ," *Opt. - Int. J. Light Electron Opt.* **140**, 626–633 (2017).

74. D. Gabor, "A new microscopic principle," *Nature* **161**, 777–778 (1948).
75. W. Xu, M. H. Jericho, I. a. Meinertzhagen, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holography for biological applications.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2001).
76. B. Kemper, P. Langehanenberg, S. Kosmeier, F. Schlichthaber, C. Remmersmann, G. von Bally, C. Rommel, C. Dierker, and J. Schnekenburger, "Digital Holographic Microscopy: Quantitative Phase Imaging and Applications in Live Cell Analysis," *Handb. Coherent-Domain Opt. Methods*, ISBN 978-1-4614-5175-4. Springer Sci. Bus. Media New York, 2013, p. 215 **1**, 215 (2013).
77. D. Mas, J. Garcia, C. Ferreira, L. M. Bernardo, and F. Marinho, "Fast algorithms for free-space diffraction patterns calculation," *Opt. Commun.* **164**, 233–245 (1999).
78. F. Shen and A. Wang, "Fast-Fourier-transform based numerical integration method for the Rayleigh-Sommerfeld diffraction formula," *Appl. Opt.* **45**, 1102–1110 (2006).
79. J. Li and P. Picart, "Calculating Diffraction by Fast Fourier Transform," in *Digital Holography* (John Wiley & Sons, Inc., 2012), pp. 77–114.
80. C. Mann, L. Yu, C.-M. Lo, and M. Kim, "High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography," *Opt. Express* **13**, 8693–8698 (2005).
81. O. K. Ersoy, *Diffraction, Fourier Optics and Imaging* (John Wiley & Sons, 2006).
82. T. Kreis, *Handbook of Holographic Interferometry: Optical and Digital Methods* (Wiley-VCH Verlag Ed, 2006).
83. J. F. Restrepo and J. Garcia-Sucerquia, "Magnified reconstruction of digitally recorded holograms by Fresnel-Bluestein transform.," *Appl. Opt.* **49**, 6430–6435 (2010).
84. P. Piedrahita-Quintero, C. Trujillo, and J. Garcia-Sucerquia, "JDiffraction," <https://unal-optodigital.github.io/JDiffraction/>.
85. M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram, "Image processing with ImageJ," *Biophotonics Int.* **11**, 36–41 (2004).
86. C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nat Meth* **9**, 671–675 (2012).
87. P. Piedrahita-Quintero, R. Castañeda, and J. Garcia-Sucerquia, "Numerical Wave Propagation plugin for ImageJ," <http://unal-optodigital.github.io/NumericalPropagation/>.
88. P. Piedrahita-Quintero, C. Trujillo, and J. Garcia-Sucerquia, "Digital Lensless Holographic Microscopy plugin for ImageJ," <https://unal-optodigital.github.io/DLHM/>.
89. J. W. Cooley and J. W. Tukey, "An Algorithm for the Machine Calculation of Complex

- Fourier Series," *Math. Comput.* **19**, 297–301 (1965).
90. L. Bluestein, "A linear filtering approach to the computation of discrete Fourier transform," *IEEE Trans. Audio Electroacoust.* **18**, 451–455 (1970).
 91. J. J. Barton, "Photoelectron holography," *Phys. Rev. Lett.* (1988).
 92. S. K. Jericho, J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Submersible digital in-line holographic microscope," *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 1–10 (2006).
 93. S. Seo, T.-W. Su, D. K. Tseng, A. Erlinger, and A. Ozcan, "Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics," *Lab Chip* **9**, 777–787 (2009).
 94. A. Doblás, E. Sánchez-Ortiga, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, and J. Garcia-Sucerquia, "Accurate single-shot quantitative phase imaging of biological specimens with telecentric digital holographic microscopy," *J. Biomed. Opt.* **19**, 46022 (2014).
 95. J. F. Restrepo and J. Garcia-Sucerquia, "Diffraction-based modeling of high-numerical-aperture in-line lensless holograms.," *Appl. Opt.* **50**, 1745–1752 (2011).
 96. E. Sánchez-Ortiga, A. Doblás, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, and J. Garcia-Sucerquia, "Off-axis digital holographic microscopy: practical design parameters for operating at diffraction limit," *Appl. Opt.* **53**, 2058–2066 (2014).
 97. J. R. Fienup, "Reconstruction of an object from the modulus of its Fourier transform," *Opt. Lett.* **3**, 27–29 (1978).
 98. J. R. Fienup, "Phase retrieval with continuous version of hybrid input-output," in *Frontiers in Optics* (Optical Society of America, 2003), p. Th13.
 99. L. Megel, D. D. P. Kelly, T. Meinecke, S. Sinzinger, and T. U. Ilmenau, "Iterative Phase Retrieval and the Important Role Played by Initial Conditions," *Fringe 2013* 123–128 (2014).
 100. J. R. Fienup, "Space Object Imaging Through The Turbulent Atmosphere," *Opt. Eng.* **18**, 185529-185529- (1979).
 101. J. R. Fienup, "Improved Synthesis and Computational Methods for Computer-Generated Holograms.," (1975).
 102. J. R. Fienup, "Iterative Method Applied To Image Reconstruction And To Computer-Generated Holograms," *Opt. Eng.* **19**, 193297-193297- (1980).
 103. J. R. Fienup, "Reconstruction of a complex-valued object from the modulus of its Fourier transform using a support constraint," *J. Opt. Soc. Am. A* **4**, 118–123 (1986).
 104. M. H. Maleki and A. J. Devaney, "Noniterative reconstruction of complex-valued objects from two intensity measurements," *Opt. Eng.* **33**, 11–33 (1994).

105. J. D. Trolinger, R. A. Belz, and W. M. Farmer, "Holographic Techniques for the Study of Dynamic Particle Fields," *Appl. Opt.* **8**, 957–961 (1969).
106. F. Dubois, C. Yourassowsky, O. Monnom, J.-C. Legros, O. Debeir, P. Van Ham, R. Kiss, and C. Decaestecker, "Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration," **11**, 54032–54035 (2006).
107. R. I. Tobey, M. E. Siemens, O. Cohen, M. M. Murnane, H. C. Kapteyn, and K. A. Nelson, "Ultrafast extreme ultraviolet holography: dynamic monitoring of surface deformation," *Opt. Lett.* **32**, 286–288 (2007).
108. D. M. Small, W. Y. Sanchez, M. J. Hickey, and G. C. Gobe, "Multiphoton fluorescence microscopy of the live kidney in health and disease Multiphoton fluorescence microscopy of the live kidney in health and disease," *J. Biomed. Opt.* **19**, 20901 (2014).
109. U. Schnars and W. P. O. Jüptner, "Digital recording and numerical reconstruction of holograms," *Meas. Sci. Technol.* **13**, 85–101 (2002).
110. C. A. Trujillo and J. Garcia-Sucerquia, "Automatic method for focusing biological specimens in digital lensless holographic microscopy," *Opt. Lett.* **39**, 2569–2572 (2014).
111. C. Trujillo and J. Garcia-Sucerquia, "Comparative analysis of the modified enclosed energy metric for self-focusing holograms from digital lensless holographic microscopy," *Appl. Opt.* **54**, 5102–5108 (2015).
112. C. Trujillo and J. Garcia-Sucerquia, "Cooperative execution of auto-focusing metrics in digital lensless holographic microscopy for internal-structured samples," *Appl. Opt.* **56**, 5877–5882 (2017).
113. T. M. Kreis, "Frequency analysis of digital holography with reconstruction by convolution," *Opt. Eng.* **41**, 11–41 (2002).