



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de un prototipo de microscopio holográfico digital sin lentes certificable open-source

Heberley Tobón Maya, Eng

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Física
Medellin, Colombia
2023

Desarrollo de un prototipo de microscopio holográfico digital sin lentes certificable open-source

Heberley Tobón Maya, Eng

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ingeniería Física

Director (a):

Jorge Iván García Sucerquia, Ph.D

Línea de Investigación:

Procesamiento Opto-Digital

Grupo de Investigación:

Óptica y Procesamiento Opto-Digital

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

2023

*A Samuel Zapata, Carlos Buitrago, mis padres,
mis tías y mis mascotas.*

Agradecimientos

Este documento contiene la realización de la formación y el trabajo conjunto que podido desarrollar los últimos dos años como miembro del grupo de investigación de Óptica y Procesamiento Opto-Digital. Todos los resultados consignados en esta tesis son el punto de convergencia de más de 10 años de trabajo del grupo en torno al desarrollo de una tecnología que pueda ser verdaderamente transferible en nuestro contexto social, agradezco a todos los miembros, pasados y presentes, por tan gran esfuerzo y dedicación.

Agradezco además al profesor Jorge I. García Suerquia por la creación de un programa de investigación sólido, que es coherente con los objetivos de los programas curriculares de nuestra facultad y que ha permitido durante 20 años la formación de profesionales de alto nivel y el desarrollo de tecnología con un alto potencial de impacto social. Agradezco al profesor por guiarme durante los últimos cinco años, son su esfuerzo, su paciencia y dedicación por estructurar mi proceso de formación los factores determinantes que me han permitido llegar a lo que soy a nivel profesional; mis logros académicos, laborales y profesionales nunca se hubiesen podido consolidar su certero acompañamiento y guía.

Naturalmente agradezco a Carlos Buitrago, Samuel Zapata y Alejandra Gómez mis compañeros de grupo de investigación, quienes estuvieron a mi lado mis proyectos y mi proceso de formación. Cada uno aportó siempre de forma constructiva y con una mirada crítica al trabajo que consolidó alrededor de esta tesis.

Agradezco a todas las personas involucradas en la concepción de la Política Nacional de Ciencia Abierta, por crear un documento que soporte de forma contundente la democratización de conocimiento en nuestro país.

Por último, agradezco a la Universidad Nacional y a la Facultad de Ciencias por sus programas de apoyo en la a la investigación en particular aquellos dedicados a facilitar la asistencia a eventos investigativos de carácter nacional e internacional.

Resumen

Desarrollo de un prototipo de microscopio holográfico digital sin lentes certificable open-source.

La microscopia holográfica digital sin lentes (DLHM) es tal vez la tecnología más simple en términos de hardware para la observación de muestras sin tinción; una fuente de iluminación coherente de ondas esféricas, un sistema digital de registro y un cuerpo mecánico para integrarlos, constituyen el hardware necesario para su implementación, lo cual perfila a DLHM como una tecnología con un alto potencial de ser desarrollada de forma abierta, portable y accesible a un bajo costo. A pesar de este potencial las soluciones comerciales de DLHM se encuentran lejos de ser una tecnología accesible a diversos sectores de la educación, investigación y producción debido alto costo y baja portabilidad.

En esta tesis de maestría en Ingeniería Física se condensan, refinan y articulan los diseños de DLHM producidos por el grupo de Óptica y Procesamiento Opto-Digital (GODP) relativos a los elementos constituyentes de la tecnología, para desarrollar un prototipo de microscopio DLHM certificable como hardware open-source. Para lograrlo se realizó un levantamiento del estado del arte de las características necesarias para que un prototipo de DLHM sea considerado como hardware open-source, se estudiaron los diferentes desarrollos del GDOP respecto a la fuente de iluminación y sistemas de registros en DLHM y finalmente se desarrolló un prototipo con base en los elementos constituyentes de mejor desempeño y las características necesarias su certificación.

Los resultados de esta tesis se encuentran condensados en 2 artículos publicados en revistas indexadas, en la participación en 4 congresos de carácter internacional (LAOP 2022, RIAO 2023, ENO 2021, ETOP 2023) con 7 contribuciones en forma de presentación y un workshop de holografía digital dictado en el marco del 10th International Symposium "Optics & its applications" patrocinado por el ICTP.

Palabras clave: Microscopia holográfica digital, Microscopia, Open-source Hardware, Open-Science

Abstract

Development of digital lensless holographic microscope certifiable as open source hardware.

Digital Lensless Holographic Microscopy (DLHM) is perhaps the simplest technology in terms of hardware for label-free sample observation. A coherent spherical wave illumination source, a digital recording system, and a mechanical body for integration, are the necessary hardware components for its implementation. This simplicity of hardware sets DLHM as a technology with high potential for open, portable, and cost-effective development. Despite this potential, commercial DLHM solutions are far from being accessible to many sectors in education, research, and production, mainly due to its high costs and low portability.

In this Master's thesis in Engineering in Physics, the designs of DLHM developed by the Optics and Opto-Digital Processing group (GOPD) concerning the constituent elements of the technology are condensed, refined, and articulated in the development of a certifiable open-source hardware prototype of a DLHM microscope. To achieve this, a survey of the state-of-the-art characteristics necessary for a DLHM prototype to be considered as open-source hardware was conducted. The different developments of GOPD regarding the illumination source and recording systems in DLHM were studied, and finally, a prototype was developed based on the best-performing constituent elements and the necessary certification characteristics.

The results of this thesis are condensed in two articles published in indexed journals and the participation in four international congresses (LAOP 2022, RIAO 2023, ENO 2021, ETOP 2023) with seven contributions in the form of presentations, and a workshop on digital holography delivered within the framework of the 10th International Symposium "Optics & its applications," sponsored by the ICTP.

Keywords: Digital holographic microscopy, Microscopy, Open-Source Hardware, Open-Science

Contenido

| | Pág. |
|--|-------------|
| Resumen | IX |
| Lista de figuras | XIII |
| Lista de tablas | XV |
| Introducción | 1 |
| 1. Open-Science y Open-source Hardware: Perspectivas globales y panorama nacional. | 3 |
| 1.1 UNESCO: Proyecto de recomendación en ciencia abierta. | 3 |
| 1.2 Política Nacional de Ciencia Abierta en Colombia. | 5 |
| 1.2.1 El papel de la Universidad Nacional de Colombia. | 6 |
| 1.3 Certificación y Licenciamiento Open-Source Hardware en términos de OSHWA. | 7 |
| 1.3.1 Impacto de los desarrollos OSH. | 9 |
| 1.3.2 Microscopía holográfica digital sin lentes, una tecnología con alto potencial de impacto bajo un esquema de desarrollo de OSH..... | 10 |
| 2. Microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM) y desarrollos necesarios para su certificación open source | 12 |
| 2.1 DLHM: fundamentos conceptuales..... | 12 |
| 2.2 Elementos constitutivos de DLHM..... | 14 |
| 2.2.1 Software. | 15 |
| 2.2.2 Sistema de registro..... | 16 |
| 2.2.3 Fuente de iluminación..... | 17 |
| 3. Direccionando los elementos constitutivos de DLHM desarrollados por el GODP a componentes de un prototipo certificable como OSH. | 20 |
| 3.1 Estandarización de la medida de la apertura numérica. | 20 |
| 3.2 Dispositivo para la fabricación de COFT certificable como OSH. | 23 |
| 3.3 Adecuación de unidades de lectura de Blu-Ray como fuentes de iluminación de alta apertura numérica y de bajo costo. | 27 |
| 3.4 Lentes esféricas de bajo costo y su integración en un prototipo de DLHM OSH. | 29 |
| 4. Prototipo de microscopio holográfico digital sin lentes certificable como OSH | 35 |
| 4.1 Descripción del Hardware. | 35 |
| 4.1.1 Sistema de Iluminación..... | 36 |

| | | |
|---------------------|--|-----------|
| 4.1.2 | Sistema de Registro..... | 37 |
| 4.1.3 | Desplazador de la muestra y cuerpo..... | 38 |
| 4.2 | Cumplimiento de condiciones OSH..... | 40 |
| 4.2.1 | Materiales: Adquisición, métodos y costos de fabricación..... | 41 |
| 4.2.2 | Infraestructura: Cumplimiento de Normativa Ambiental y de manufactura..... | 41 |
| 4.3 | Desempeño del prototipo..... | 42 |
| 4.3.1 | Pruebas en entornos Controlados..... | 43 |
| 4.3.2 | Pruebas en entornos no controlados..... | 44 |
| 4.3.3 | Pruebas en entornos relevantes..... | 46 |
| 4.3.4 | Madurez tecnológica del microscopio diseñado..... | 48 |
| 4.4 | Potencialidades del prototipo propuesto..... | 49 |
| 4.4.1 | Enseñanza..... | 49 |
| 4.4.2 | Futuras integraciones con modelos de inteligencia artificial..... | 50 |
| 5. | Conclusiones y recomendaciones..... | 53 |
| 5.1 | Conclusiones..... | 53 |
| 5.2 | Recomendaciones..... | 55 |
| A. | Anexo: Manuscritos y productos..... | 57 |
| B. | Anexo: Plano de despiece del prototipo diseñado..... | 58 |
| C. | Anexo: Tabla de piezas y materiales..... | 59 |
| D. | Anexo: Computo del coeficiente esférico primario..... | 63 |
| Bibliografía | | 65 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1-1: Estructura de la ciencia abierta definida por la UNESCO, adaptada de [12]. | 4 |
| Figura 2-1: Ilustración de un montaje experimental de DLHM. | 13 |
| Figura 2-2: Interfaz gráfica del plugin de reconstrucción de DLHM para ImageJ. | 16 |
| Figura 2-3: Variación de un perfil de intensidad. (a) Registro con Reflejo (b) Variación del Coeficiente R2 respecto al fotograma inicial de un video de (a). | 18 |
| Figura 2-4: Extremos de fibra óptica. (a) Fibra óptica de punta recta (b) COFT. La barra de escala corresponde a 125 μm | 19 |
| Figura 3-1: Diagrama transversal de un haz gaussiano propagándose en el espacio y los dos puntos de medida separados Δz | 22 |
| Figura 3-2: Perfiles de intensidades para un haz de luz gaussiano producido por una fibra óptica SM600. (a) Intensidad registrada normalizada. (b) Distribución de intensidad gaussiana estimada numéricamente para el registro del en el panel (a). Los paneles (c) y (d) son perfiles de intensidad para la distribución registrada y ajustada, a lo largo del eje x e y, respectivamente. | 23 |
| Figura 3-3: Render el prototipo diseñado(a) y su correspondiente ensamble (b) | 24 |
| Figura 3-4: Validación del prototipo para la fabricación de COFT, (a) muestra la COFT fabricada, (b) muestra el perfil de iluminación producido por (a). Los paneles (c) y (d) presentan el holograma de un test USAF producido con (b) y su respectiva reconstrucción. | 26 |
| Figura 3-5: Validación de DLHM soportada por ADL en múltiples longitudes de onda. Los paneles (a), (b) y (c) muestran las reconstrucciones en intensidad de la sección transversal de la cabeza de una <i>Drosophila Melanogaster</i> , utilizando 405nm ,654nm y 780nm respectivamente. Los paneles (d), (e) y (f) muestran las reconstrucciones en fase. | 29 |
| Figura 3-6: Perfil de iluminación de un diodo láser, adaptado de [114] (a) y aberraciones presentes hologramas debido a su acople directo a lentes esféricas. El panel (b) muestra tanto el astigmatismo como la distorsión producto de la presencia aberración esférica [116], (c) muestra el astigmatismo heredado de la fuente de iluminación. | 30 |
| Figura 3-7: Iluminación en prototipos de DLHM. El panel (a) muestra esquema actual desarrollado por el GODP tomada de [3]. El panel (b) ilustra esquema de iluminación propuesto para la eliminación del astigmatismo en el perfil de intensidad y la reducción de la longitud de aberración esférica. | 32 |
| Figura 3-8: Hologramas en línea utilizando el método de corrección del diafragma y sus correspondientes reconstrucciones con diferente magnificación. | 34 |

| | |
|--|----|
| Figura 4-1: Prototipo de microscopio holográfico digital sin lentes certificable como OSH. | 35 |
| Figura 4-2: Modulo de Iluminación. El panel (a) ilustra el encapsulado de iluminación, donde un espejo ① es utilizado para redireccionar la iluminación producida por un diodo láser ② el cual se encuentra fijo al cuerpo ③ y es energizado por un módulo DC-DC ④ el cual es alimentado por un puerto USBC ⑤. En el panel (b) se ilustra el sistema de posicionamiento del soporte de la lente esférica ⑥, el cual reposa sobre una pieza móvil ⑦ que se desliza respecto a una guía fija ⑧, con un movimiento controlado por una manivela ⑨ dispuesta en el lateral del diseño..... | 37 |
| Figura 4-3: Sistema de registro. Compuesto por una manivela ① que controla el movimiento en z, un soporte para el sistema de registro ②, una cámara USB de 5 megapíxeles ③ y un sistema fijo que se compone de dos piezas ④ y ⑤. | 38 |
| Figura 4-4: Cuerpo del microscopio. En el panel (a) se observa el cuerpo ensamblado mientras que en el panel (b) se observa explotado del módulo inferior cuerpo. Las piezas observadas corresponden al soporte de la muestra①, placas de soporte ② y base ③, manivelas de desplazamiento④ y ⑤, elementos del desplazamiento lineal de la muestra ⑥, ⑦, ⑧ y ⑨ y tapas inferiores ⑩, ⑪, ⑫ y ⑬..... | 39 |
| Figura 4-5: Prototipo Fabricado..... | 42 |
| Figura 4-6: Pruebas en Entorno Controlado USAF 1951. El panel (a) muestra el holograma registrado con el prototipo producido por la iluminación registrada en el panel (b), el panel (c) muestra la reconstrucción en fase de (a) evidenciando una capacidad de resolución del elemento 5 del grupo 8..... | 43 |
| Figura 4-7: Pruebas de calibración en entorno no controlado. El panel (a) y (b) muestran registros de calibración utilizando el prototipo propuesto para diferentes distancias fuente muestra. Los paneles (c) y (d) muestran las correspondientes reconstrucciones de intensidad. | 44 |
| Figura 4-8: Validación de prototipo propuesto en la observación de muestras de amplitud. El panel (a) y (b) muestran el holograma y la reconstrucción intensidad de una pierna de insecto. El panel (c) y (d) muestran el holograma y la reconstrucción de intensidad de la espiga de una <i>gramínea</i> | 45 |
| Figura 4-9: Validación de prototipo propuesto en la observación de muestras de fase. El panel (a) y (b) muestran el holograma y la reconstrucción fase de células epiteliales bucales. El panel (c) y (d) muestran el holograma y la reconstrucción de fase de un extendido delgado de sangre..... | 46 |
| Figura 4-10: Taller de holografía, Santiago de Cali. En el panel (a) se observan estudiantes preparando muestras de células epiteliales bucales, cuyo holograma se observa en el panel (b), adicionalmente se muestra cómo se observa la superficie de la lente de uno de los anteojos de los estudiantes en el panel (c)..... | 50 |
| Figura 5-1: Evolución del coeficiente esférico primario Zs..... | 63 |

Lista de tablas

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1-1: Requisitos de un proyecto OSH. | 8 |
| Tabla 1-2: Requisitos de licenciamiento de un proyecto OSH. | 9 |
| Tabla 4-1: Cumplimiento de requisitos OSH del prototipo propuesto. | 41 |
| Tabla 4-2: Recomendaciones de desempeño. | 47 |
| Tabla 4-3: Cumplimiento de TRL. Según Normativa UNAL, basado en [120]. | 48 |

Introducción

La microscopía óptica es el gold standard para la detección y diagnóstico de diversas enfermedades infectocontagiosas [1,2]. Sin embargo, debido a su alto costo operacional, baja portabilidad y el hecho de requerir técnicos especializados para su uso, el acceso a esta tecnología en zonas remotas y de condiciones geográficas adversas es altamente limitado. Como alternativa para superar los problemas mencionados anteriormente de la microscopía óptica, la microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM por sus siglas en inglés) surge como una alternativa portátil, de bajo costo y de alto desempeño para la obtención de imágenes microscópicas sin tinción [3].

El único hardware requerido por DLHM es una fuente puntual de ondas esféricas para iluminar la muestra, una cámara digital para registrar el patrón de difracción de la muestra a analizar y un cuerpo que soporte la fuente, la cámara y la muestra [4]. El patrón de difracción registrado se denomina holograma digital [4] y se procesa numéricamente para recuperar un imagen de la muestra, en un proceso denominado reconstrucción, el cual se lleva a cabo mediante la implementación numérica de la integral de difracción de Kirchhoff-Helmholtz [5].

A pesar de la poca complejidad del hardware necesario para su operación, la distribución comercial de DLHM se hace a precios poco accesibles para sectores de bajo poder adquisitivo. La distribución está diseñada, en su versión más versátil, para laboratorios y ambientes altamente controlados [6], o en su versión funcionalizada para aplicaciones en ambientes peligrosos, lo que aumenta aún más el rango de precios [7]. Sin embargo, la técnica de DLHM no es ajena a la iniciativa de open-source [8], y al igual que ocurre con la microscopía de campo brillante [9], los métodos de manufactura rápida han invitado a la construcción de prototipos de DLHM versátiles y económicos [3,10,11], como una alternativa a las costosas soluciones comerciales.

El desarrollo open-source alrededor de DLHM es de especial importancia en nuestro contexto. La UNESCO reconoce en su proyecto de recomendación sobre ciencia

abierta [12], la importancia de la filosofía open-source como un elemento clave para la transferencia y apropiación social del conocimiento, un esfuerzo en el cual Colombia se ha enmarcado recientemente con en el desarrollo de una política nacional de ciencia abierta [13]. Los desarrollos alrededor de la tecnología de DLHM llevados a cabo por el grupo de óptica y procesamiento opto-digital (GODP) de la Universidad nacional de Colombia sede Medellín, lo perfilan como líder en procesos de democratización de DLHM con avances orientados, entre otros, a la construcción de sistemas de DLHM que usen fuentes no convencionales [14–16], mejoras en la calidad de la imagen [17,18], software libre para el procesamiento numérico [5,19] y sistemas robustos de DLHM que integren todo lo mencionado previamente en prototipos robustos, funcionales y de bajo costo [3].

Incluso con la simplicidad de la arquitectura DLHM, el diseño de prototipos open-source de DLHM optimizados para su reproducción tecnológica sin barreras de acceso es una labor ardua; idealmente, dichos prototipos utilizan componentes fácilmente disponibles en el mercado, procesos estándar de manufactura, infraestructura abierta, contenido sin restricciones y herramientas ya certificadas como open-source, para maximizar la capacidad de las personas para fabricar y utilizar el hardware [20]. Quizás el punto más crítico en el proceso de diseño de un prototipo funcional real open-source, es la integración de los diferentes tipos de fuentes de iluminación [3,10,11], sistemas mecánicos y de registro digital, puesto que esta tarea demanda una alta experiencia y un riguroso proceso de prueba para la funcionalización de cada prototipo.

En esta tesis de maestría en Ingeniería Física se condensan, refinan y articulan los diseños de DLHM producidos por el ODP relativos a los elementos constituyentes de la tecnología, para desarrollar un prototipo de microscopio DLHM certificable como hardware open-source. Para lograrlo se realizó un levantamiento del estado del arte de las características necesarias para que un prototipo de DLHM sea considerado como hardware open-source, se estudiaron los diferentes desarrollos del GODP respecto a la fuente de iluminación y sistemas de registros en DLHM y finalmente se desarrolló un prototipo con base en los elementos constituyentes de mejor desempeño y las características necesarias su certificación [20].

1. Open-Science y Open-source Hardware: Perspectivas globales y panorama nacional.

1.1 UNESCO: Proyecto de recomendación en ciencia abierta.

Los últimos años se ha producido un aumento considerable de proyectos open-source software (OSS) y open-source hardware (OSH) [21–24]. Ante un panorama tan amplio de desarrollo, la necesidad de una definición estándar y específica del significado de “open” empezó a tornarse un tema recurrente en la literatura científica [25–27], llegando incluso a proponerse escalas de definición de que tan abierto podía considerarse un proyecto [28]. Como documento regulador de todas estas posibles definiciones, en Noviembre de 2021, la asamblea general de la UNESO publicó su proyecto sobre recomendaciones en materia de ciencia abierta [12]. Este documento define de forma general los conceptos de OSS y OSH como habilitadores de la producción de conocimiento científico abierto y que se condensan en la **Figura 1-1**.

El proyecto define la ciencia abierta (OSc) como una práctica para hacer que el conocimiento científico esté abiertamente disponible, accesible y reutilizable para todos; que permita aumentar las colaboraciones científicas y el intercambio de información en beneficio de la ciencia y la sociedad. La OSc comprende todas las disciplinas científicas y todos los aspectos de las prácticas académicas, y se soporta en el conocimiento científico abierto, la infraestructura de la ciencia abierta, la participación abierta de agentes sociales y del diálogo abierto con otros sistemas de conocimiento, como se ilustra en la . [12]

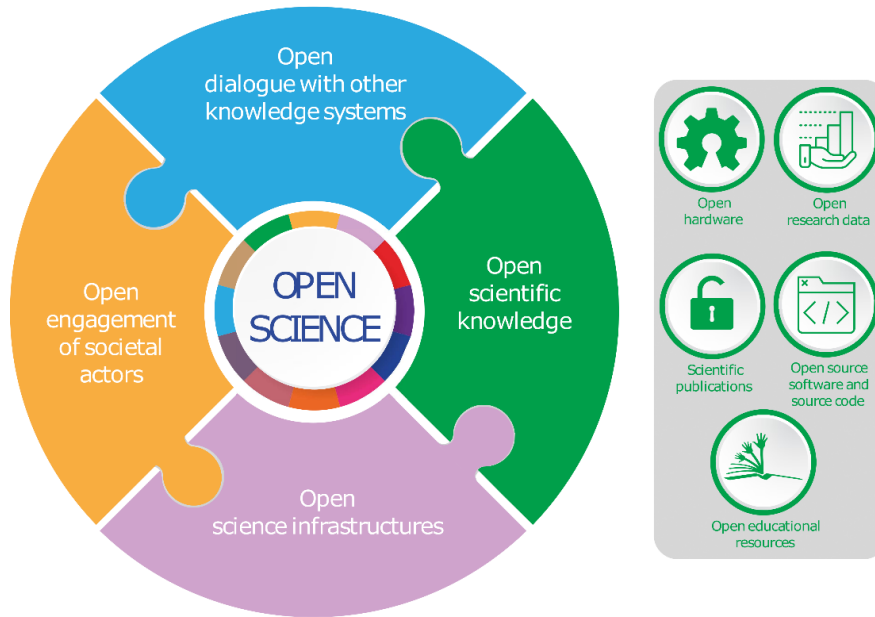


Figura 1-1: Estructura de la ciencia abierta definida por la UNESCO, adaptada de [12].

En un segundo nivel de abstracción, el proyecto define el conocimiento científico abierto, OSK por sus siglas en inglés. Este concepto se refiere, entre otros, al acceso abierto a publicaciones científicas, datos de investigación, OSS y OSH que estén disponibles en el dominio público o bajo derechos de autor; en un esquema de “*licencia abierta*” que permita el acceso, la reutilización, la adaptación y la distribución en condiciones específicas, proporcionada a todos los actores y de forma gratuita.

En consecuencia, la UNESCO reconoce que las principales barreras que enfrenta la generación de OSK son la reproducción, difusión y apropiación, de métodos y procedimientos científicos, ya que están limitados por la capacidad de acceso a infraestructura y hardware específicos. Además, estos últimos se encuentran comúnmente protegidos como diseños industriales bajo patentes o licencias que restringen su uso y distribución de alguna manera.

Siguiendo esta línea de ideas, la UNESCO identifica el OSH como un elemento necesario para hacer disponible el OSK y lo define como cualquier tipo de diseño o de objeto físico que está licenciado de tal manera que dicho objeto puede ser estudiado, modificado, creado y distribuido por cualquier persona.

A pesar del papel clave del OSH como facilitador de la generación de OSK, la UNESCO no aborda a detalle procesos específicos para la construcción y licenciamiento de OSH más allá de las generalidades. Sin embargo, en este aspecto hay avances realizados por

organizaciones internacionales reconocidas por UNESCO [29], como “The Open Source Hardware Association”, OSHWA por sus siglas en inglés, que define los esquema de propiedad intelectual, licenciamiento y características necesarias para certificar un proyecto como OSH [20]; en el panorama local, hay un avance en normativa, para definir las reglas de juego de la ciencia abierta, el licenciamiento y la liberación de conocimiento desde un nuevo panorama legal [13].

1.2 Política Nacional de Ciencia Abierta en Colombia.

El panorama político nacional no es ajeno a las iniciativas para la generación de OSK y promoción de la OSc. El 3 de Agosto de 2022 se firmó la Política Nacional de Ciencia Abierta (PNCA) con el objetivo de “aumentar el acceso, la visibilidad, la reproducibilidad y la utilidad de los datos, recursos, productos y resultados tecnológicos y de innovación colombianos” [13]. La PNCA recoge la gran mayoría de las observaciones planteadas por la UNESCO en materia OSc [30–32] con el ánimo de definir las condiciones de acceso a todos aquellos productos de interés que se generen a partir del ejercicio investigativo en el país.

En este sentido la PNCA reconoce el problema que genera la protección intelectual en un marco de acceso sin restricciones a los contenidos y productos de procesos de investigación y desarrollo. En respuesta a la necesidad de definir un esquema de trabajo para la liberación sin restricciones a productos de investigación, surgen dos regulaciones que ayudan a definir las reglas de juego para el establecimiento de la OSc en Colombia; la primera es la Resolución 166 de 2019; que conforma la Red Colombiana de Información científica como un mecanismo por el medio de cual se desarrollen los componentes de acceso y datos abiertos del país; la segunda es la resolución 361 de 2020 que en su artículo 2 con el propósito de fomentar la ciencia abierta define como norma que:

“quien con recursos públicos adelante o ejecute proyectos de investigación y desarrollo de ciencia, tecnología e innovación, se obliga a poner a disposición del estado y de otros investigadores a través del medio que designe el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación para el efecto, los datos y procedimientos de la investigación tales como, cuadernos de notas, cuadernos de campo, protocolos experimentales, videos de experimentos y todos los demás elementos intermedios comunicables y potencialmente

útiles para otros investigadores, así como poner en acceso abierto, las prepublicaciones (preprints) o versiones previas a la revisión por pares". [13]

Estas y muchas más observaciones legales en torno al OSc y el OSH componen la PNCA. Adicional a ellos, se hace referencia particular a la necesidad de concretar herramientas de licenciamiento libre, las cuales al día de hoy no existen o no están definidas con claridad. Esto con el ánimo que desde las universidades y el estado se pueda otorgar la libertad a cualquier persona de usar, estudiar, modificar y distribuir de forma libre y sin restricciones de ninguna condición los productos científicos apoyados por recursos públicos.

1.2.1 El papel de la Universidad Nacional de Colombia.

Es común que el papel de las universidades en los procesos de licenciamiento, asociados a los productos de investigación, sea el de conservar los derechos patrimoniales. Esto se debe a que generalmente desde las universidades se contribuye al desarrollo de dichos productos bien sea en especie o en capital, intentando con esta conservación preservar el patrimonio institucional. La Universidad Nacional de Colombia no es la excepción; en términos de licenciamiento OSH no cuenta con un mecanismo claro para la liberación de conocimiento y productos de investigación bajo un licenciamiento abierto, y guarda reserva de los derechos y formas de licenciamiento de todos los productos sobre los cuales posea derechos patrimoniales o de propiedad intelectual.

Este panorama no es desalentador para el desarrollo de esta tesis, puesto que legalmente ya se contempla la necesidad de nuevas formas de licenciamiento para las universidades. En la PNCA, se proyectan mesas de trabajo, comprendidas por entes gubernamentales y universidades, para definir el contenido y las formas de licenciamiento libre, siendo este último crucial para la correcta implementación de la política pública.

En paralelo a la PNCA el Plan Nacional de Desarrollo (PND) [33] ratifica la necesidad de la transferencia libre de datos y resultados de investigación financiados con recursos públicos en sus artículos 170 y 171 que permiten definir mecanismos de licenciamiento libre sin incurrir en detrimento de la propiedad intelectual de las obras y obligan a poner a disposición de la ciudadanía los resultados, productos, publicaciones y datos derivados de la investigación a través de infraestructuras y sistemas de información científicos estandarizados, lo cual es necesario para una correcta implementación de la PNCA.

Mientras desde las universidades se trabaja en una definición estandarizada de licenciamiento libre en conjunto con el estado, es prudente contar con un referente internacional en términos de licenciamiento; en este sentido las licencias definidas por el MIT y el CERN [34,35], son tal vez las más populares en los proyectos OSH y OSS y con mayor potencial para proyectar su uso en Colombia, sin embargo, el referente más indicado para asegurar el cumplimiento de las características de open-source, respecto a un hardware determinado o diseño industrial, es sin duda la previamente mencionada OSWHA.

1.3 Certificación y Licenciamiento Open-Source Hardware en términos de OSWHA.

The Open-Source Hardware Association (OSWHA), es una organización sin ánimo de lucro encargada de promover los principios del OSH; define las características del OSH a la vez que establece un mecanismo de certificación y licenciamiento que permiten el verdadero uso libre y sin posibles contramedidas de toda clase hardware protegido por su marco de certificación.

La definición de OSWHA de open-source hardware [20] no dista en ningún aspecto de la ofrecida por la UNESCO. Sin embargo, es mucho más específica, debido a que establece una serie de criterios y parámetros, englobados en la **Tabla 1-1**, que deben cumplirse con el ánimo de verdaderamente pensar hardware de cualquier clase como open-source, es así como OSWHA define:

“Open-Source Hardware es aquel hardware cuyo diseño se hace disponible públicamente para que cualquier persona lo pueda estudiar, modificar, distribuir, materializar y vender, tanto el original como otros objetos basados en ese diseño. Las fuentes del hardware (entendidas como los ficheros fuente) habrán de estar disponibles en un formato apropiado para poder realizar modificaciones sobre ellas. [...] el hardware de fuentes abiertas utiliza componentes y materiales de alta disponibilidad, procesos estandarizados, infraestructuras abiertas, contenidos sin restricciones, y herramientas de fuentes abiertas de cara a maximizar la habilidad de los individuos para materializar y usar el hardware. El hardware de fuentes abiertas da libertad de controlar la tecnología y al mismo tiempo compartir conocimientos y estimular la comercialización por medio del intercambio abierto de diseños.” - OSWHA [20]

Tabla 1-1: Requisitos de un proyecto OSH.

| ¿Es mi Hardware Certificable bajo los Requisitos de OSHWA? | | |
|---|---|-----------------|
| Item | Descripción | ¿Cumple? |
| Documentación. | Su diseño se hace disponible públicamente y sin restricciones para que cualquier persona lo pueda: estudiar y modificar | S/N |
| Componentes. | Utiliza Componentes fácilmente disponibles en el mercado. | S/N |
| Procesos | Utiliza procesos estándar permiten su reproducción. | S/N |
| Libre de Restricciones fabricación | No requiere para su fabricación de infraestructura de uso restringido o especializada. | S/N |
| | Cualquier persona lo puede fabricar. | S/N |
| Libre de Distribución | Cualquier persona lo puede distribuir, materializar y vender. | S/N |

En resumen, para OSHWA, OSH es un término para denominar artefactos tangibles cuyo diseño ha sido publicado de forma tal que cualquier persona pueda fabricar, modificar, distribuir y usar. Sin embargo, la libre distribución y uso de cualquier diseño susceptible a mecanismos de propiedad intelectual demanda definir una serie de reglas específicas consignadas en un licenciamiento que verdaderamente permita aprovechar completamente las capacidades de cualquier OSH. Es por esto que una vez establecidos los criterios para que un diseño pueda considerarse OSH, OSHWA provee de una guía para el desarrollo y evaluación de licencias del mismo, reconocido incluso por la DIN 3105 [36], que define OSH como todo aquel hardware bajo el esquema de certificación y licenciamiento de OSHWA. En este sentido OSHWA define un segundo conjunto de requisitos para poder certificar cualquier hardware como OSH en términos de la licencia de uso libre y sin restricciones del hardware a certificar. Dichos requisitos se consignan en la **Tabla 1-2**.

Tabla 1-2: Requisitos de licenciamiento de un proyecto OSH.

| Requisitos para una Licencia OSH | |
|---|--|
| Definición | Descripción |
| Documentación. | Ficheros de diseño que permitan la modificación y redistribución de los archivos. Si la documentación no acompaña al medio físico deberá proporcionarse de manera clara la forma en la que debe conseguirse dicha información. |
| Alcance | Definición de que parte del diseño si no es que es todo se libera bajo la licencia de OSHWA |
| Software necesario | Si el Hardware bajo licencia precisa de un software particular, bien como parte del mismo o para operar de forma apropiada y funcionar adecuadamente se debe considerar que el software esté lo suficientemente bien documentado o que esté disponible bajo una licencia de OSS. |
| Obras Derivadas | Se deberán permitir modificaciones y obras derivadas, y permitir a su vez que se distribuyan bajo los términos de la licencia original sin ninguna restricción |
| Libre de Distribución | No se puede restringir ante nadie la distribución bien sea del hardware o de la documentación del proyecto |
| Atribución | Se podrá requerir que los documentos derivados y notificaciones de copyright asociadas con el proyecto licenciado atribuyan autoría a los licenciantes, sin embargo, no se podrá especificar el formato para que se muestre. |
| No Discriminación | La licencia no puede restringir a nadie de hacer uso del hardware licenciado en ningún campo específico. |

Una vez cumplidos con todos los requisitos de la **Tabla 1-1** y estando dispuesto a proveer información de la forma consignada en la **Tabla 1-2** se puede solicitar una certificación OSH para un diseño particular, acompañado de una licencia de uso libre, con duración de un año, completamente renovable y gratuita, que sirve para certificar un diseño como OSH.

1.3.1 Impacto de los desarrollos OSH.

Con fecha de corte el mes mayo de 2023, OSHWA ha certificado 2077 proyectos que son totalmente accesibles y cuentan con una licencia de uso libre. Entre ellos son de notable importancia la “Original Prusa MINI” [37] y todos los diseños de elementos comerciales de grandes distribuidores como Adafruit [38], sin embargo, hay gran cantidad de contenido OSH disponible para ser usado [39] que no necesariamente cuenta con una licencia pero permite su libre uso y distribución, ayudando a la construcción y equipamiento de

laboratorios con hardware especializado y asequible. Se estima que el uso de OSH en laboratorios puede ahorrar hasta un 87% de costos [40] versus la compra directa de equipos especializados en venta por los distribuidores originales.

Más allá de del impacto económico en investigación, el OSH ha sido de vital importancia para campos muy concretos de la medicina [24,41,42]. Durante la pandemia del COVID-19 los desarrollos OSH permitieron mitigar la precaria situación de abastecimiento médico, como fueron ventiladores y equipo de protección personal. La filosofía de licenciamiento OSH permitió la difusión rápida de la tecnología y habilitó una línea, de distribución libre, que permitiera suplir las necesidades del momento [24].

De forma general el OSH es una gran alternativa para el desarrollo médico al permitir la modificación del hardware y contar con suficiente documentación tanto como para producción y mantenimiento del hardware, como para su uso y distribución. El OSH desarrollado en torno a la medicina permite acercar a las personas al conocimiento y también a servicios básicos de salud [42]. Esto, sin duda, es de vital importancia para países en condición de desarrollo, donde, de acuerdo con la OMS, entre el 70% y el 90% de todos los equipos médicos donados nunca funcionan como deberían [43], alrededor de un 15% de fallas se debe a la imposibilidad de acceder a repuestos técnicos adecuados y un 20% a la falta de documentación para el uso o reparación, problemas que pueden ser resueltos completamente bajo un esquema de desarrollo OSH [20,44] cumpliendo los requisitos listados en **Tabla 1-1** y **Tabla 1-2**

1.3.2 Microscopía holográfica digital sin lentes, una tecnología con alto potencial de impacto bajo un esquema de desarrollo de OSH.

En el contexto médico previamente mencionado de los países en vía de desarrollo, el campo de detección y diagnóstico clínico es uno de los más afectados por las condiciones del hardware y los requerimientos técnicos de su uso. Los laboratorios clínicos de patología, dedicados principalmente a la detección y el diagnóstico de enfermedades [42,45], generalmente demandan equipos robustos y de alto costo económico, lo que impide un correcto desarrollo de sus labores y limita el acceso a servicios de salud [45]. Tal es el caso de la microscopía óptica, que ha sido reconocida como el gold standard para la detección y diagnóstico de enfermedades infectocontagiosas, como por ejemplo la malaria [46]. Esta herramienta exhibe las características de baja portabilidad, alto costo,

demanda de personal especialmente e instalaciones especialidades previamente mencionadas, lo cual limita su uso extendido en zonas de escasos recursos socioeconómicos. Este es sin duda un panorama desalentador en muchos aspectos, sobre todo para los miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) como lo es Colombia, que en su agenda global de desarrollo sostenible incluyen promover el desarrollo universal, equitativo y sostenible a los servicios de salud.

En reconocimiento a esta necesidad, numerosos esfuerzos en el marco filosófico establecido por OSH han propuestos arquitecturas de microscopia óptica orientadas a democratizar su uso [47–49]. Una tecnología con un alto potencial de superar estas adversidades al ser desarrollada bajo un esquema OSH, es la microscopia holográfica digital sin lentes (DLHM) que surge como una alternativa portátil, rde bajo costo y de alto desempeño para la obtención de imágenes microscópicas sin tinción [3]. El único hardware requerido por DLHM es una fuente puntual de ondas esféricas para iluminar la muestra, una cámara digital para registrar el patrón de difracción de la muestra a analizar y un cuerpo que soporte la fuente, la cámara y la muestra. [4] DLHM es, debido a su capacidad para la observación de imágenes de objetos microscópicos sin el uso de marcadores, una técnica que se perfila como una alternativa bastante superior a los diversos desarrollos de microscopia OSH [9,47,50], puesto que potencialmente permite abordar problemas adicionales de la detección y el diagnóstico clínico, como lo son la limitación de uso de químicos altamente contaminantes en el proceso de observación de diversas muestras.

En esta tesis de maestría en Ingeniería Física se condensan, refinan y articulan los diseños de DLHM producidos por el ODP relativos a los elementos constituyentes de la tecnología, para desarrollar un prototipo de microscopio DLHM certificable como hardware open-source. Para lograrlo estudiarán los diferentes desarrollos del GODP respecto a la fuente de iluminación y sistemas de registros en DLHM y finalmente se desarrollará un prototipo con base en los elementos constituyentes de mejor desempeño que cuente con las características necesarias su certificación OSH.

2. Microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM) y desarrollos necesarios para su certificación open source.

Este capítulo describe la microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM) desde sus fundamentos conceptuales. Los elementos constitutivos de DLHM son enumerados y se evalúa su potencial de integración un diseño OSH.

2.1 DLHM: fundamentos conceptuales.

Durante las últimas décadas la investigación y el desarrollo de microscopía en torno a la obtención de imágenes sin tinción han mostrado un creciente avance [51–56]. Entre las técnicas que permiten dicha clase de observación se encuentra la microscopía holográfica digital (DHM), que ha encontrado un gran rango de aplicaciones en biomedicina [53,57], ciencia los materiales [58,59] y metrología [60,61]. Entre las múltiples implementaciones de DHM, la microscopía holográfica digital sin lentes (DLHM) [62], que constituye una realización moderna del invento original de Gabor [63], es una de las arquitecturas más simples en términos de hardware; una fuente de iluminación de ondas esféricas divergentes, un sistema de registro digital y un cuerpo mecánico, constituyen los elementos físicos necesario para su implementación.

DLHM es una técnica de dos etapas; en la primera etapa una fuente puntual de ondas esféricas ilumina una muestra situada a una distancia z de la fuente de iluminación. El campo óptico difractado por la muestra, comúnmente denominado onda objeto, se propaga hacia un sensor digital ubicado a una distancia L de la fuente puntual, tal como se observa en la **Figura 2-1**. El patrón de difracción de la muestra se magnifica naturalmente durante su propagación en el espacio libre por las propiedades divergentes del frente de onda esférico utilizado como iluminación. El valor de la magnificación está determinado por la

configuración geométrica de las distancias antes mencionadas [62,64], y se define $M = L/z$.

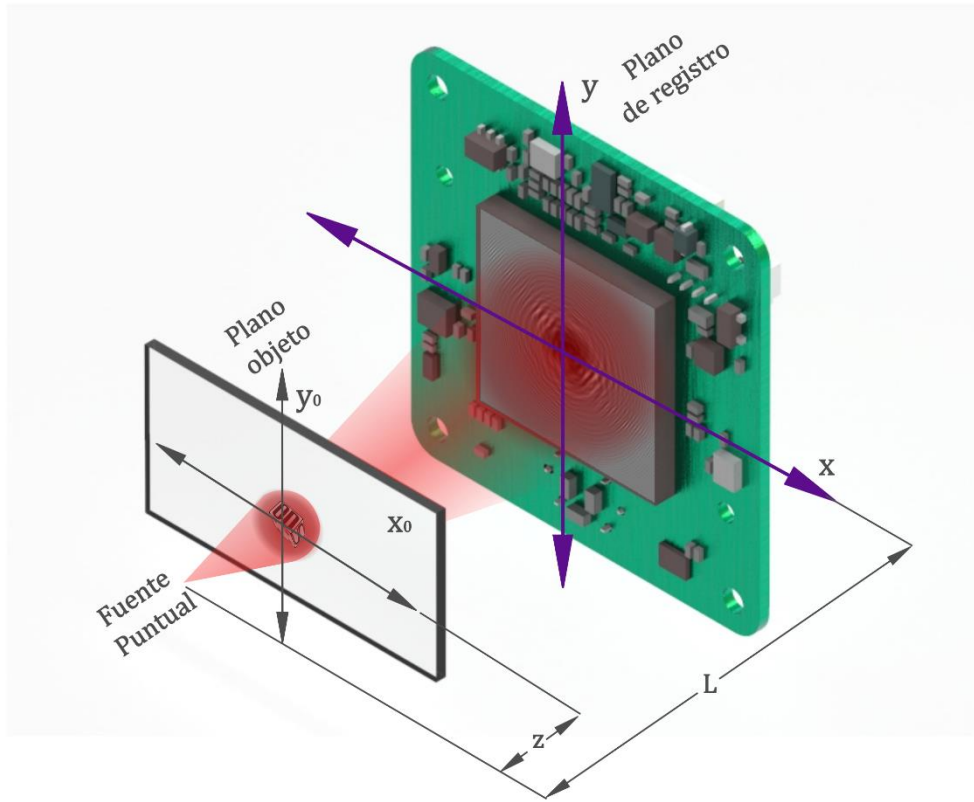


Figura 2-1: Ilustración de un montaje experimental de DLHM.

El registro de intensidad $I(\vec{r})$ resultante constituye el holograma digital y puede describirse adecuadamente mediante la difracción de Rayleigh-Sommerfeld [65] de un frente de onda esférico divergente $\exp(ik\vec{r})/|\vec{r}|$ que incide sobre una muestra de transmitancia $S(\vec{r}_0)$:

$$I(\vec{r}) = \left| \int S(\vec{r}_0) \frac{\exp(ik\vec{r}_0)}{|\vec{r}_0|} \frac{\exp(ik(\vec{r} - \vec{r}_0))}{|\vec{r} - \vec{r}_0|} d\vec{r}_0 \right|^2, \quad (2.1)$$

donde $k = 2\pi/\lambda$ es el número de onda, λ la longitud de onda, y $\vec{r}_0(x_0, y_0, z)$, $\vec{r}(x, y, L)$ los vectores posición medidos desde la fuente puntual al plano de la muestra y al plano de registro respectivamente.

Recuperar la información de la muestra constituye la segunda etapa de DLHM; esto implica calcular numéricamente el proceso de difracción del holograma registrado $I(\vec{r})$ cuando es iluminado por un frente de onda esférico convergente $\exp(-ik\vec{r})/|\vec{r}|$, sobre el plano de la

muestra, en adelante llamado el plano de reconstrucción. Esto puede, una vez más, expresarse a través de la fórmula de difracción:

$$U(\vec{r}_0) = \int I(\vec{r}) \frac{\exp(-ik\vec{r}) \exp(-ik(\vec{r} - \vec{r}_0))}{|\vec{r}| |\vec{r} - \vec{r}_0|} d\vec{r}. \quad (2.2)$$

Del campo complejo resultante de la ecuación (2.2) se pueden recuperar tanto la intensidad de la muestra, $I_r(\vec{r}_0) = U(\vec{r}_0)U^*(\vec{r}_0)$, como distribución de fase, $\phi(\vec{r}_0) = \text{atan}(\text{Im}[U(\vec{r}_0)]/\text{Re}[U(\vec{r}_0)])$, siendo $\text{Im}()$ y $\text{Re}()$ las partes imaginaria y real del campo respectivamente, y $\text{atan}()$ la función arco-tangente. En cualquiera de las dos representaciones, la distancia mínima Δr a la que dos objetos deben estar ubicados para observarse de forma independiente, se establece mediante la resolución de la técnica, tal como se indica en [66,67]:

$$\Delta r \geq \frac{\lambda}{2 NA}. \quad (2.3)$$

En la ecuación (2.3) la apertura numérica (NA) está determinada por el valor más pequeño entre la NA de la fuente de iluminación y la NA efectiva de la geometría de la configuración de registro [66]; la primera es intrínseca a la fuente puntual y está definida por el seno del ángulo medio del cono máximo de iluminación multiplicado por el índice de refracción del medio de propagación $NA = n \sin(\theta)$, mientras que la segunda está definida geoméricamente por:

$$NA = \frac{W}{2\sqrt{\left(\frac{W}{2}\right)^2 + L^2}}. \quad (2.4)$$

2.2 Elementos constitutivos de DLHM

A continuación, se describen desde su potencial como elementos de un prototipo OSH los elementos constitutivos de DLHM. Como se mencionó previamente, el único hardware requerido por DLHM está constituido por una fuente puntual de ondas esféricas para iluminar la muestra, una cámara digital para registrar el patrón de difracción y un cuerpo mecánico que los integre, que enlazados a un entorno de procesamiento digital permiten recuperar la información de la muestra bajo estudio. Debido a que direccionar el cuerpo del microscopio hacia un elemento OSH, dependerá en gran medida de su concepción y

de los métodos de fabricación [68,69], lo que se explorarán en el capítulo 4 de esta tesis. En consecuencia, en este título se discuten el software necesario para el proceso de reconstrucción, el sistema de registro y la fuente de iluminación requeridos para el diseño de un prototipo de DLHM.

2.2.1 Software.

La implementación numérica del proceso de propagación descrito en la ecuación (2.3) generalmente requiere que el holograma registrado $I(x, y, L)$ sea previamente procesado. Un registro de intensidad de la fuente puntual sin presencia de la muestra $I_0(x, y, L)$, en adelante llamado referencia, es sustraído del holograma registrado $I(x, y, L)$ generando así un nuevo conjunto de datos $\tilde{I}(x, y, L)$, al cual llamaremos el holograma de contraste. La resta se realiza para remover posibles inhomogeneidades de la iluminación y la presencia del orden cero de difracción en el proceso de reconstrucción [64].

En términos de software, DLHM cumple con los requisitos para respaldar un prototipo que se licencie de forma OSH como se enlista la **Tabla 1-2**. Un plugin OSS [5], desarrollado por el GODP para el entorno procesamiento de imágenes ImageJ [70], integra tanto el proceso de difracción para la recuperación de la información de la muestra, implementado mediante la integral numérica de Kirchhoff-Helmholtz, como el procesamiento necesario para el cálculo del holograma de contraste. El plugin se encuentra ampliamente documentado, es de uso amigable y se puede descargar desde [71].

La **Figura 2-2** muestra la interfaz de reconstrucción del plugin previamente mencionado. El grupo ①, resaltado en azul, corresponde a las variables de entrada del software. Ingresar los registros digitales de un holograma y su correspondiente referencia, acompañados de los parámetros del sistema físico de registro, permite interactuar con el grupo ② de la interfaz, en el cual el usuario define a información a recuperar a partir de los registros digitales. Por último, el grupo ③ se compone de una ventana que muestra el resumen de las operaciones realizadas.

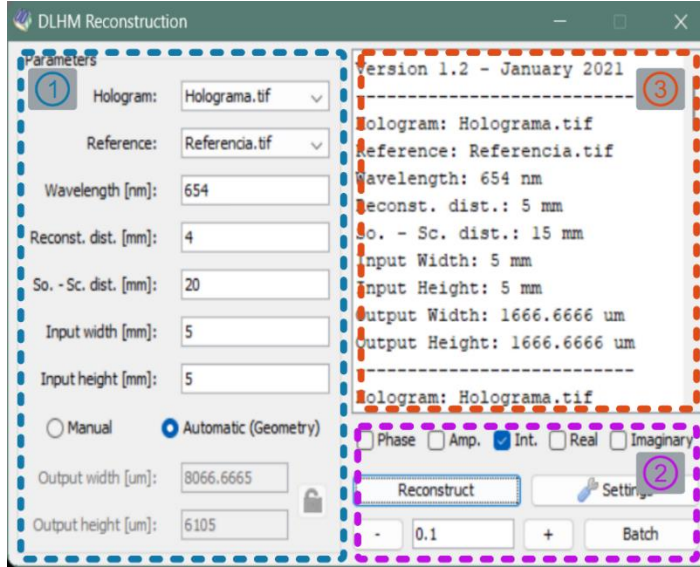


Figura 2-2: Interfaz gráfica del plugin de reconstrucción de DLHM para ImageJ.

2.2.2 Sistema de registro.

El desarrollo de cámaras digitales es una tarea que requiere capacidades de manufactura de nivel industrial. Afortunadamente, el apogeo de los teléfonos celulares ha generado un crecimiento exponencial de la fabricación de sensores de imagen CMOS [72] y la adquisición de estos últimos, puesto que son elementos comercialmente disponibles, no supone un obstáculo en el desarrollo de un sistema de DLHM OSH.

En DLHM la información de la muestra recuperada dependerá por completo del tamaño del sensor y el tamaño de del pixel Δp_x del sistema de registro seleccionado. El primero está directamente relacionado NA efectiva como se establece en ecuación (2.4), y el segundo, como se define en la ecuación (2.5) [73], está relacionado con condiciones físicas de registro y la NA . El Δp_x necesario para el correcto muestreo de un patrón de difracción está directamente ligado a la magnificación; para un valor NA fijo, entre menor sea la distancia $L - z$ menor será la magnificación de la información difractada y el correcto muestreo de un holograma implicara un tamaño de píxel reducido:

$$\Delta p_x < \frac{(L - z)}{3^2 \sqrt{(1/NA)^2 - 1}} \quad (2.5)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones (2.4) y (2.5), el sistema de registro óptimo será aquel que posea formato lo suficientemente amplio como para no reducir la NA efectiva y lo suficientemente pequeño en tamaño de píxel, para no presentar problemas de muestreo.

2.2.3 Fuente de iluminación.

La implementación más común para la generación de una fuente puntual de ondas esféricas en DLHM se logra focalizando un frente de onda plano en un pinhole con un diámetro del orden de la longitud de onda λ de la fuente de iluminación. Esta tarea requiere de sistemas mecánicos robustos, pues la alineación del pinhole es altamente susceptible a las condiciones mecánicas del entorno. La **Figura 2-3** presenta la variación del perfil de intensidad de una iluminación para DLHM realizada con base en un pinhole cuando el sistema no se encuentra completamente aislado de las vibraciones mecánicas del entorno. Un portaobjetos de vidrio simulando la muestra es posicionado a 1 mm de la fuente de iluminación; inhomogeneidades como las observadas en el área delimitada por el círculo morado del panel (a) son comunes debido a reflejos producidos entre la vidriería donde comúnmente se posicionan las muestras, y la superficie reflectiva del pinhole cuando ambos elementos no se encuentran dispuestos de forma paralela. Estas estructuras pueden presentar variaciones en el tiempo producto de las vibraciones mecánicas del entorno, esto sucede cuando la frecuencia de vibración es significativamente menor a la frecuencia de integración del sensor de registro. La **Figura 2-3** (b) muestra la evolución temporal del coeficiente de correlación R-cuadrado [74,75] del área comprendida al interior del círculo violeta y del perfil de intensidad trazado a lo largo de la línea verde durante 4.5 s. La variación del registro de intensidad se debe a la vibración de baja frecuencia producida por la influencia mecánica del sistema de ventilación de un computador posicionado sobre la superficie donde se encuentra el montaje.

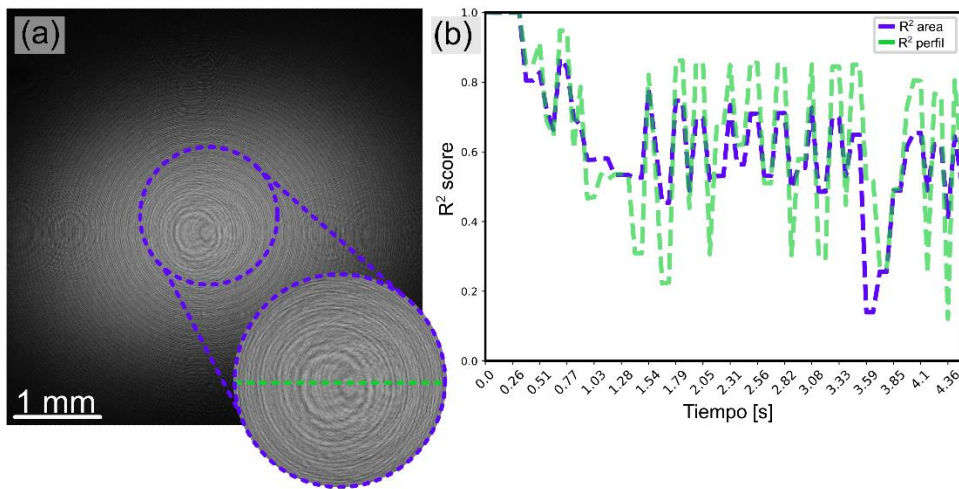


Figura 2-3: Variación de un perfil de intensidad. (a) Registro con Reflejo (b) Variación del Coeficiente R2 respecto al fotograma inicial de un video de (a).

A pesar de poderse fabricar por completo con materiales disponibles en el mercado y de contar con documentación necesaria para su reproducción, el esquema de iluminación soportado por pinhole no puede considerarse como parte de un diseño certificable como OSH. La complejidad mecánica del montaje implica que el requisito de libre fabricación, enumerado en la **Tabla 1-1**, no se pueda cumplir. Solo personal altamente capacitado con acceso a infraestructura especializada estará en la capacidad de construir sistemas iluminación robustos soportados en pinhole.

Resolver el problema del módulo de la iluminación en un prototipo OSH implica el uso de fuentes de iluminación alternativas. Las fibras ópticas de punta cónica [14], las unidades de lectura de Blu-Ray [76], y las lentes asféricas [3,77,78] también han sido reportadas como opciones para la producción de fuentes de iluminación adecuadas para DLHM.

La integración de fibras ópticas de punta cónica (COFT) como fuente de iluminación para DLHM ha sido ampliamente explorada por el GDP como una alternativa a iluminación soportada por pinhole [14–16,79]. La capacidad de modificar el perfil recto de una fibra óptica como el observado **Figura 2-4** panel (a) y crear de conos de diferentes ángulos como el observado en el panel (b) permite controlar la NA de la fibra resultante [79]. A diferencia de la iluminación soportada por pinhole, las COFT no son comerciales y el estado del arte de su fabricación demanda infraestructura especializada [15,80,81]. Por lo

tanto, el desarrollo necesario para orientar las COFT hacia el elemento constitutivo de un prototipo de DLHM OSH se debe centrar la construcción de una alternativa en términos de hardware OSH en torno su proceso de fabricación.

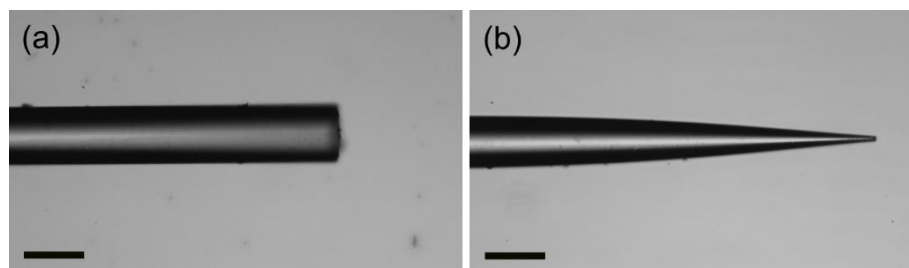


Figura 2-4: Extremos de fibra óptica. (a) Fibra óptica de punta recta (b) COFT. La barra de escala corresponde a 125 μm .

Como última alternativa, las lentes esféricas de alta NA constituyen un reemplazo prometedor para los pinhole en DLHM. A diferencia de las COFT las lentes esféricas son fácilmente asequibles en el mercado en diversas presentaciones, incluyendo sus versiones difractivas con NA típicas de 0.85, las cuales se encuentran integradas en los lectores de Blu-Ray, acoplar estos últimos a un dispositivo OSH demanda el desarrollo de un sistema electrónico de control para su correcta integración a un prototipo de DLHM.

Por otro lado, en su forma convencional, las lentes esféricas cuentan con rangos de NA que varía entre 0.2 y 0.7, y generalmente tienen incorporados recubrimientos antireflectivos lo que evita fenómenos como el observado en la **Figura 2-3** (a). Estas lentes suelen contar con monturas, igualmente comerciales, que hacen que su integración a las carcasas de diodos láser comerciales sea inmediata, por lo cual se perfilan como un candidato con alto potencial como elemento de un dispositivo OSH según las características enlistadas en la **Tabla 1-1** y su integración a un prototipo de DLHM implica el desarrollo de un sistema de iluminación que las integre de forma adecuada.

3. Direccinando los elementos constitutivos de DLHM desarrollados por el GODP a componentes de un prototipo certificable como OSH.



Considerando que tanto el software necesario para la recuperaci3n de informaci3n en DLHM como los sistemas de registro disponibles no presentan incompatibilidades con la filosofa de desarrollo OSH, este capitulo presenta los avances necesarios para orientar las diferentes alternativas de iluminaci3n exploradas por el GODP hacia elementos constitutivos de un prototipo OSH. Un m3todo autom3tico para el c3lculo de la apertura num3rica, el desarrollo OSH para fabricaci3n de COFT, un sistema de control para el uso de lectores de Blu-Ray y una aproximaci3n al uso de lentes asf3ricas de bajo costo como fuentes de iluminaci3n en DLHM son presentados en este capitulo.

3.1 Estandarizaci3n de la medida de la apertura num3rica.

En todas las posibles fuentes de iluminaci3n previamente mencionadas, la NA es un par3metro fundamental, ya que determina la resoluci3n del sistema [59,60] como se establece en la ecuaci3n (2.3). La capacidad de medir la NA del frente de onda de forma sistem3tica es la primera necesidad de desarrollo abordada en esta tesis en torno a la fuente de iluminaci3n para DLHM. Lamentablemente, la propagaci3n te3rica de los haces de luz en forma de ondas planas o esf3ricas no coincide con la naturaleza real de la luz [82,83]. El primer caso, implica un frente de onda homog3neo que transporta energa en un plano que existe en todas partes, y el segundo se origina a partir de una fuente puntual espacial que diverge en todas las direcciones angulares. Ambos son modelos te3ricos 3tiles, pero no se pueden implementar en un laboratorio. Las implementaciones

experimentales más cercanas a ambas aproximaciones son los haces Gaussianos con divergencia de décimas de mili-radianes para el caso de las ondas planas y con NA de hasta 0.88 [14] para los frentes de onda esféricos.

En este sentido, el primer aporte en torno a la fuente de iluminación de DLHM de esta tesis es un método para la medida automática de la NA ; el cual constituye una publicación en la revista *Óptica Pura y Aplicada* [84] y una presentación en el XVII Encuentro nacional de Óptica y XIII Conferencia Andina y del Caribe en Óptica y sus aplicaciones, Medellín Colombia, ambos, el trabajo publicado y la ponencia sometida, se anexan al final de esta tesis.

| | |
|---|---|
|  | Automatic method to measure the numerical aperture of a propagating Gaussian light beam. [84] |
|  | Método automático para la medición de la apertura numérica de haces de luz Gaussianos. |

Tal como se desarrolla en [84], medir la NA de un perfil de intensidad Gaussiano $I(x, y, z)$ descrito por:

$$I(x, y, z) = A_0 \exp \left[-\frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{2 \sigma^2(z)} \right], \quad (3.1)$$

donde A_0 representa la amplitud del perfil, (x_0, y_0) las coordenadas de origen y $\sigma(z)$ el ancho del haz a una distancia z medida desde la cintura del haz, implica determinar cómo varía σ a medida que el haz se propaga una distancia Δz conocida, tal como se indica en la ecuación (3.2):

$$NA = \sin \left[\arctan \left(\frac{2\Delta\sigma}{\Delta z} \right) \right]. \quad (3.2)$$

La determinación de la NA requiere el registro de dos perfiles de intensidad separados una distancia Δz como muestra la **Figura 3-1**, a partir de los cuales se puede estimar manualmente $\Delta\sigma$. Si bien la distancia se puede determinar con precisión, las medidas de las desviaciones estándar dependen, en gran medida, de la experticia del usuario. Es común que $\Delta\sigma$ se compute realizando un ajuste Gaussiano unidimensional a lo largo de un

perfil de intensidad definido arbitrariamente por usuario, con el fin de aplicar la relación establecida en la ecuación (3.2).

Para eliminar el error introducido por el usuario en la determinación $\Delta\sigma$, el método desarrollado en [84] implementa un ajuste bidimensional haciendo uso de un estimador no lineal sobre las dos imágenes registradas a lo largo del eje de propagación. En cada registro de intensidad, el usuario define un área de interés, dentro de la cual se muestrea aleatoriamente. El conjunto de datos muestreado se ajusta a una función Gaussiana 2D como se describe en la ecuación (3.1). La desviación estándar es uno de los parámetros retornados por el algoritmo de ajuste [85], el cual es implementado haciendo uso de la rutina de optimización de mínimos cuadrados (DLS) de la librería SciPy [86]. $\Delta\sigma$ se calcula a partir de los datos devueltos por la rutina de DLS para cada uno de los registros de intensidad, los cuales en conjunto con Δz permiten calcular la apertura numérica.

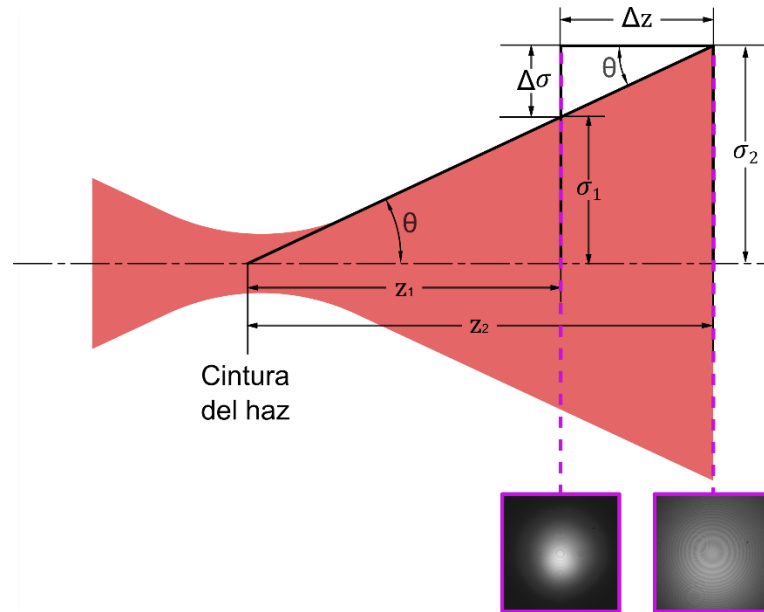


Figura 3-1: Diagrama transversal de un haz gaussiano propagándose en el espacio y los dos puntos de medida separados Δz .

La **Figura 3-2** muestra la validación del método propuesto en [84] para el ajuste de las funciones Gaussianas a los perfiles de intensidad registrados. El método propuesto fue probado para fibras ópticas SM600 y SM450 obteniendo un error de 3,45% respecto a la NA reportada por el fabricante, adicionalmente fue testeado en la medición de la NA de una lente esférica calibrada retornando un valor de 0.58, en comparación al reportado por

el fabricante de 0.6. La información detallada del método y su validación experimental se encuentran en el documento adjunto al final de esta tesis [84].

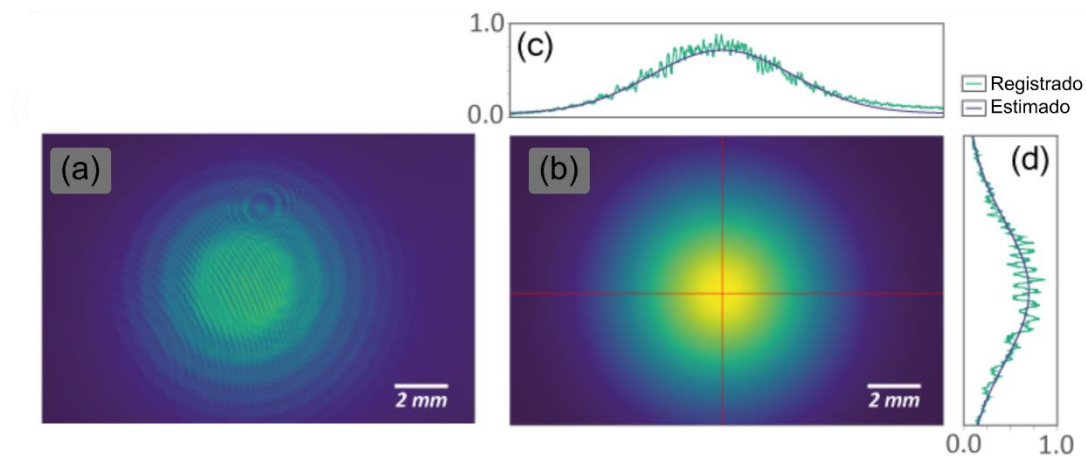


Figura 3-2: Perfiles de intensidades para un haz de luz gaussiano producido por una fibra óptica SM600. (a) Intensidad registrada normalizada. (b) Distribución de intensidad gaussiana estimada numéricamente para el registro del en el panel (a). Los paneles (c) y (d) son perfiles de intensidad para la distribución registrada y ajustada, a lo largo del eje x e y, respectivamente.

3.2 Dispositivo para la fabricación de COFT certificable como OSH.

Romper las barreras asociadas al uso de COFT implica explotar el potencial de estandarizar su fabricación mediante la implementación de OSH. El proceso de fabricación de las COFT se lleva a cabo comúnmente mediante el método de ataque químico de Turner [80]. La geometría de la punta de fibra es el resultado de la interacción de la superficie de vidrio de sílice con ácido fluorhídrico (HF), que es utilizado como agente reactivo en el proceso. La modificación de la punta de la fibra se logra en una región restringida geoméricamente, definida por un menisco formado entre el ácido y un recubrimiento de aceite agregado a la superficie del reactivo [80,81,87,88]. Por lo tanto, una aplicación exitosa del método requiere que la reacción química y las condiciones geométricas se conserven durante el proceso de fabricación. Para el primero, se debe evitar que el ácido interactúe con elementos del sistema que no sean la fibra, y para el segundo, la fibra debe estar correctamente posicionada en la interfase ácido-aceite, permitiendo la formación de un menisco simétrico [87,88].

En este sentido se desarrolló un prototipo certificable como OSH para la fabricación de COFT que permita asegurar las condiciones previamente mencionadas; tanto el esquemático del dispositivo como las instrucciones de ensamble y operación son condensados en un reporte técnico de hardware susceptible a publicación adjuntado al final de esta tesis.



Cost-effective and 3D printable dip-etching device for cone-shaped optical fiber tip fabrication.

La **Figura 3-3** muestra el prototipo diseñado para la fabricación de COFT. El prototipo garantiza, mediante la integración de elementos comerciales de laboratorio y componentes imprimibles en 3D, las condiciones necesarias para la fabricación de COFT. El prototipo permite la modificación simultánea de múltiples fibras. Se pueden distinguir tres elementos principales en el diseño: el recipiente de ataque químico donde se prepara el medio bifásico(acido-aceite); las guías mecánicas para asegurar la estabilidad y alineación de las fibras ópticas individuales; y los soportes impresos en 3D que permiten la integración de todos los componentes.

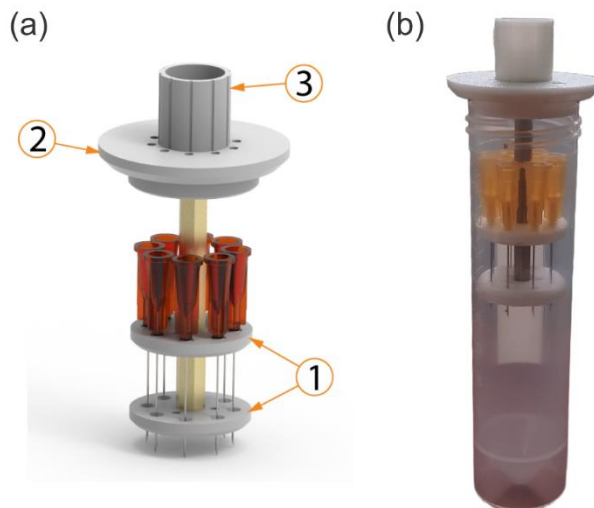


Figura 3-3: Render el prototipo diseñado(a) y su correspondiente ensamble (b)

El prototipo diseñado emplea un tubo de centrifuga de Polipropileno de 50 mL como recipiente para la reacción, el cual no presenta reacciones químicas con el HF en temperaturas inferiores a los 60°C [89,90]. El formato flexible y de diámetro reducido de las fibras ópticas representan un desafío para garantizar su estabilidad mecánica y alineación durante el proceso de fabricación de COFT. Para solucionar este problema, el diseño propuesto emplea agujas hipodérmicas como guías mecánicas para las fibras dentro del recipiente de ataque químico. El uso de agujas elimina la necesidad de soportes de fibra costosos, como el Newport FPH-S175, que de otro modo serían necesarios. La selección de una aguja adecuada debe guiarse por su diámetro interno. Este último está estandarizado y determinado por la norma ISO 9626 [91] y el calibre Birmingham [92,93] para las agujas hipodérmicas. En el diseño propuesto, agujas de 25G con un diámetro nominal interno de $0.260 \text{ mm} \pm 0.019 \text{ mm}$ se utilizan para guiar una fibra óptica monomodo SM600 de Thorlabs [94].

La **Figura 3-4** muestra la validación experimental del prototipo para la fabricación de COFT apropiadas para su implementación en DLHM. El panel (a) muestra una fibra con ángulo de 15° que corresponde a un valor de $NA = 0.2$, según la literatura [79]. La fibra se acopló a un láser de 635 nm y el frente de onda emergente, cuyo perfil de intensidad se puede observar el panel (b), se utilizó para iluminar un USAF 1951 ubicado a 0.82 mm de la fibra. El patrón de difracción resultante de esta interacción fue registrado por una cámara digital con 4640 x 3506 píxeles cuadrados, de lado de $3.8 \mu\text{m}$, ubicada a 20.5 mm de la punta de la fibra. El holograma resultante, observado en el panel (c), se reconstruyó usando el plugin previamente mencionado en esta tesis [5]. Validaciones adicionales del prototipo, los detalles de su construcción y ensamble pueden encontrarse en el documento anexo al final de esta tesis.

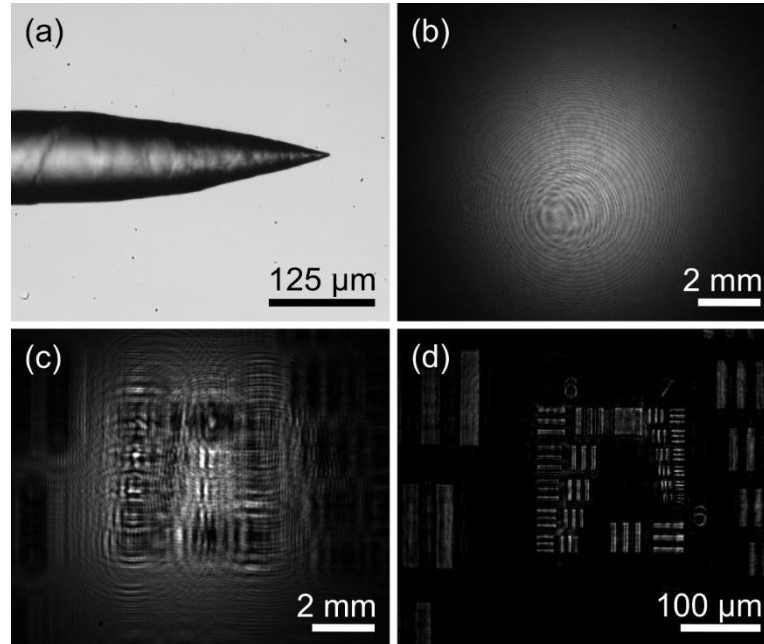



Figura 3-4: Validación del prototipo para la fabricación de COFT, (a) muestra la COFT fabricada, (b) muestra el perfil de iluminación producido por (a). Los paneles (c) y (d) presentan el holograma de un test USAF producido con (b) y su respectiva reconstrucción.

El prototipo propuesto y el trabajo condensado en el anexo previamente mencionado constituyeron una contribución de ponencia en la Reunión Iberoamericana de Óptica (RIAO) en su versión 2023 bajo la modalidad de ponencia oral.

| | |
|---|--|
|  | <p>3D printable open-source hardware for conical-shaped optical fiber tip fabrication.</p> |
|---|--|

A pesar de que todos los elementos necesarios para la fabricación de las COFT sean comerciales y que su uso como fuente de iluminación en DLHM esté ampliamente documentado [14–16,79], en Colombia existe una regulación legal que limita la adquisición de agentes químicos altamente corrosivos [95]. Por lo tanto, obtener el HF, necesario para la fabricación de las COFT, puede representar ejercicios burocráticos y de certificación significativos. De igual manera, la manipulación del ácido y por consiguiente del prototipo diseñado, deben realizarse haciendo uso de una cámara de extracción. Este panorama restringe a los usuarios potenciales de la contribución presentada a laboratorios y grupos de investigación que requieran implementar en sus procesos el uso de COFT y cumplan con la normativa vigente.

3.3 Adecuación de unidades de lectura de Blu-Ray como fuentes de iluminación de alta apertura numérica y de bajo costo.

Las lentes esféricas han demostrado ser una fuente adecuada en diversos prototipos de DLHM [3,96]. En particular las lentes esféricas difractivas (ADL) de alta apertura numérica, presentes en los lectores de Blu-ray (OPU por sus siglas en inglés), son elementos de alto interés para la microscopía y se han implementado en diversas aplicaciones de como reemplazo de objetivos de microscopio [97–102]. La usabilidad de los OPU radica en sus funcionalidades integradas [77,103–106]; cuentan con un sistema de iluminación de triple longitud de onda 780nm, 650nm y 405 nm acoplado a una ADL de alta apertura numérica diseñada para alcanzar NA de 0.85 a 405 nm. La lente a su vez tiene 3 grados de libertad al estar está posicionada en actuadores magnéticos de alta precisión [76].

Adicional a las características técnicas previamente mencionadas, los OPU se han convertido en un elemento de electrónica de consumo que puede adquirirse por menos de \$5 USD, lo que aumenta su potencial como elemento de un prototipo OSH. Para facilitar su implementación como fuente de iluminación en DLHM, en esta tesis se condensan todas las adaptaciones necesarias para utilizar un OPU PHR-803T como fuente puntual de iluminación; esta información se encuentra adjunta al final de esta tesis y representa una publicación en la revista Applied Optics, la cual reporta por primera vez el uso de los OPU en DLHM.



Adapting a Blu-ray Optical Pickup Unit as a Point Source for Digital Lensless Holographic Microscopy. [107]

Generalmente toda la información relacionada con la operación de los OPU es manejada bajo secreto industrial [76]. El aporte anexado al final de esta tesis [107] constituye avance novedoso ya que compila todo el trabajo previo realizado alrededor de los OPU en el GODP en un producto que describe los componentes de un lector PHR-803T y los mecanismos necesarios para acceder a sus funcionalidades básicas, necesarias para su integración en DLHM. La selección de la longitud de onda de la fuente de iluminación (405 nm, 654nm y 780nm), tanto como su potencia y el posicionamiento de la lente son completamente controlables haciendo uso de los elementos descritos en [107]. Toda la

información relativa al hardware de control para acceder a las funcionalidades del OPU puede descargarse de [108].

La **Figura 3-5** muestra la validación de los OPU y su desempeño en la obtención de imágenes de muestras biológicas. La sección transversal de la cabeza de una *Drosophila Melanogaster* fue observada haciendo uso del OPU PHR-803T como fuente de iluminación para DLHM. Las tres longitudes de onda son empleadas para la obtención de información de la muestra tanto en intensidad **Figura 3-5** (a)-(c) como en fase **Figura 3-5** (d)-(f). A pesar de su alto desempeño y de contar con fuentes de iluminación integrada, los OPU constituyen actualmente un elemento en proceso de desaparición del mercado. Acceder a las funciones internas de estos elementos demanda, además poseer capacidades de manufactura de PCB, acceso a componentes electrónicos poco comunes. Por estas razones los OPU se perfilan como una solución interesante para aplicaciones de laboratorio, pero no deben considerarse como el punto clave de un prototipo OSH. A pesar de esto su implementación invita al desarrollo de nuevas alternativas para la mejora de calidad de imágenes en DLHM, como se enuncia en la Ref [107] los elementos difractivos de las lentes de los OPU representan detrimentos en la calidad de las reconstrucciones de objetos de amplitud, en este sentido el desarrollo presentado en esta tesis alrededor de los OPU constituye un insumo al desarrollo de técnicas de mejoramiento de la calidad de imagen en DLHM soportadas por fuentes con alta presencia de inhomogeneidades, como se reporta en la Ref [109].

Adicionalmente, como producto de esta tesis, la información asociada a la contribución reportada en [107] fue compartida con la comunidad académica en una ponencia oral realizada en el marco de la conferencia Latin American Optics and photonics en su versión 2023.



Digital Lensless holographic microscopy based on an optical pick-up unit. [110]

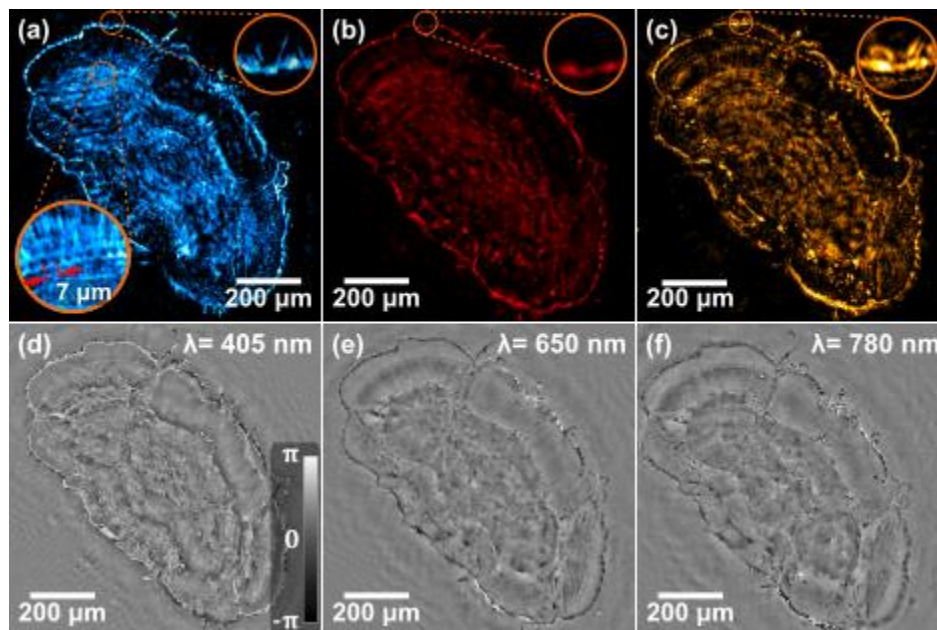


Figura 3-5: Validación de DLHM soportada por ADL en múltiples longitudes de onda. Los paneles (a), (b) y (c) muestran las reconstrucciones en intensidad de la sección transversal de la cabeza de una *Drosophila Melanogaster*, utilizando 405nm ,654nm y 780nm respectivamente. Los paneles (d), (e) y (f) muestran las reconstrucciones en fase.

3.4 Lentes esféricas de bajo costo y su integración en un prototipo de DLHM OSH.

Con un costo de adquisición de aproximado de \$3 USD y NA que varían entre 0.2 y 0.7, las lentes esféricas (AL) de bajo costo se perfilan como la fuente ideal de iluminación para un prototipo de DLHM OSH. Las AL son componentes comerciales de consumo masivo, diseñados para ser fácilmente integrados a diodos láser mediante el uso de soportes mecánicos también comerciales. Estas lentes son el único candidato de iluminación explorado por el GODP que no demanda requerimientos especiales para su adquisición o uso y que cuenta un alto potencial de integración tanto en prototipos como en montajes de laboratorio. Comúnmente, las AL incorporan recubrimientos anti-reflectivos, incluso las de bajo costo, lo que evita la presencia de fenómenos como los observados en la **Figura 2-3**. Generalmente, las lentes esféricas son utilizadas como elementos de colimación [111], sin embargo, un correcto uso de las AL para la producción frentes de onda esféricos implica

el proceso contrario, demanda iluminarlas con una onda plana para producir un frente de onda divergente con una mínima carga de aberración esférica. Esto representa un problema para los montajes fuera de laboratorio, donde de la fuente de iluminación ideal estaría constituida por diodos láser de bajo costo, que son comúnmente astigmáticos y cuentan con un eje rápido y un eje lento de propagación [112], como lo ilustra el panel (a) de la **Figura 3-6** [113,114], y necesitan la integración de elementos ópticos adicionales para su correcta circularización [115].

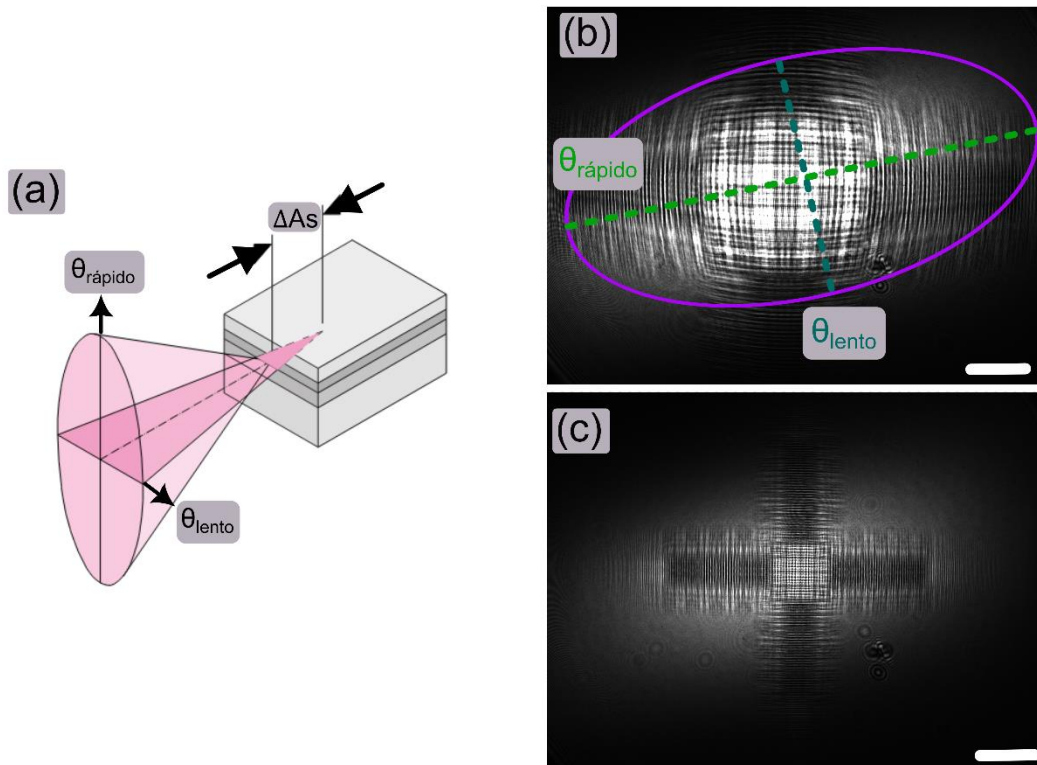


Figura 3-6: Perfil de iluminación de un diodo láser, adaptado de [114] (a) y aberraciones presentes hologramas debido a su acople directo a lentes asféricas. El panel (b) muestra tanto el astigmatismo como la distorsión producto de la presencia aberración esférica [116], (c) muestra el astigmatismo heredado de la fuente de iluminación.

En este sentido el uso de las lentes asféricas presenta dos problemas, por un lado, su integración con diodos láser de bajo costo demanda una circulación del frente de onda y por otro, es necesario iluminarlas con un frente de onda lo más plano posible para asegurar la minimización de la longitud de aberración esférica [111,116,117].

Para ilustrar ambos problemas, la **Figura 3-6** en el panel (b) y (c) muestra los hologramas de un retículo de calibración para microscopio en diferentes posiciones a lo largo del eje óptico de un sistema de DLHM sin corregir. Para producir los registros una cámara digital con 4640 x 3506 píxeles cuadrados de lado de 3.8 μm , fue dispuesta a 15 mm de una AL acoplada a un diodo láser de 654 nm haciendo uso de un soporte comercial. La longitud de la aberración esférica, producto de iluminar la AL con una onda divergente, inhabilita la obtención de hologramas sin distorsión [116] para distancias fuente-muestra menores a 3 mm medidos desde la cintura del haz producido por la lente **Figura 3-6** (b); a medida que la muestra se aleja **Figura 3-6** (c) la distorsión se reduce, pero el perfil de intensidad astigmático proveniente del láser permanece.

Integrar AL a un prototipo de DLHM OSH requiere que la solución a estos problemas no demande de equipo ni procedimientos de alineación robustos, como los que se encuentran comúnmente en los manuales técnicos [115]. Tal vez la respuesta que más se adapte a esta necesidad es usar una lente para colimar el diodo láser, tal que el eje lento de propagación sea proporcional al diámetro de la lente cuando el diodo se encuentre en posición la posición focal. Esto implica agregar una lente más al diseño. La propuesta desarrollada en esta tesis consiste en la integración de un diafragma para reducir la apertura del frente de onda que llega a la lente, haciéndola lo menos divergente posible eliminando a su vez el astigmatismo del perfil de intensidad.

Como producto de esta tesis, se anexa al final del documento el resumen sometido de una ponencia oral en la Reunión Iberoamericana de Óptica RIAO, en su versión 2023, que presentó la solución propuesta a este problema.



Cost-effective, DIY and open-source digital lensless holographic microscopy with astigmatism correction and aberration reduction.

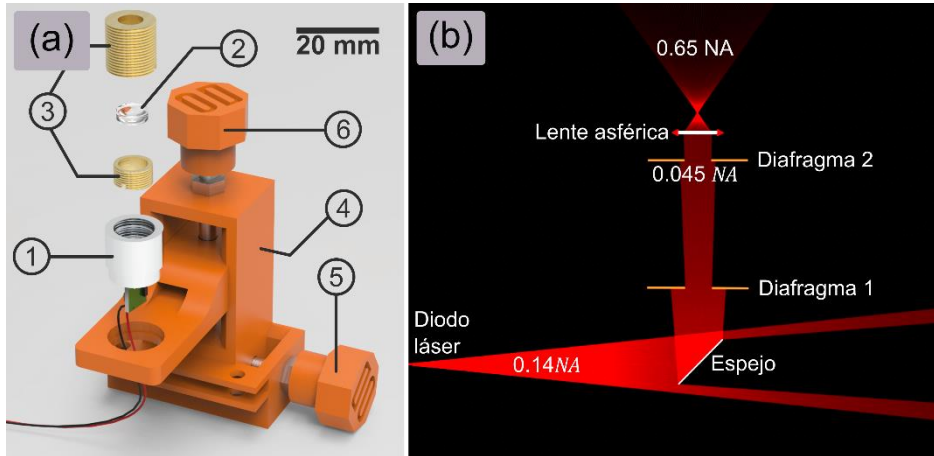


Figura 3-7: Iluminación en prototipos de DLHM. El panel (a) muestra esquema actual desarrollado por el GODP tomada de [3]. El panel (b) ilustra esquema de iluminación propuesto para la eliminación del astigmatismo en el perfil de intensidad y la reducción de la longitud de aberración esférica.

El panel (a) de la muestra el esquema de iluminación empleado en los desarrollos del GODP [3] donde un diodo láser (elemento ①) es acoplado directamente a una AL (elemento ②) haciendo uso de un soporte roscado comercial (elemento ③), integrados en un sistema de desplazamiento de dos ejes, uno axial y uno transversal al plano de la lente (elementos ④, ⑤, y ⑥). Esta integración hace que el estado del arte de los prototipos de DLHM presente problemas como los descritos en la **Figura 3-6**, donde debido a al límite de distancia fuente muestra, aumentar la magnificación implica alejar la cámara de la fuente, lo que reduce el valor de la NA efectiva descrita en la ecuación (2.4).

En esta tesis se soluciona este problema mediante el sistema descrito en la **Figura 3-7** (b). El haz producido por un diodo láser es direccionado mediante un espejo rectangular de primera superficie hacia una pareja de diafragmas de 6 mm de diámetro; el primero se encuentra posicionado aproximadamente a 40 mm de la fuente de iluminación, da forma circular al reflejo rectangular y evita que porciones adicionales del frente de onda propaguen hacia el sistema de registro; mientras que el segundo está casi en contacto con la cara anterior de la lente esférica y ubicado a 80 mm aproximadamente de la fuente de iluminación y limita el frente de onda que ilumina la lente. El paso por estas tres aperturas (el espejo y ambos diafragmas) limita de manera sucesiva la apertura del haz, conservando únicamente la región paraxial. De esta forma el haz que incide en la lente es aproximadamente uniforme y cuenta con una NA reducida a un valor cercano a 0.045. Al

implementar este cambio, el rango del trabajo del microscopio incrementa significativamente, permitiendo ahora una distancia de trabajo mínima de 0.2 mm aproximadamente, un análisis de la evolución del coeficiente esférico primario a medida que se incrementa la distancia entre laser es presentado en el **Anexo D**. En el nuevo esquema la magnificación máxima alcanzable, definida por la distancia fuente-muestra, pasa de ser $M = L[mm]/3 mm$ a $M = L[mm]/0.2 mm$ lo cual configura la solución propuesta como una aproximación prometedora donde M puede llegar a ser 15 veces mayor que en las implementaciones previamente reportadas [3], en las cuales aumentar M implicaba incrementar la distancia fuente-cámara lo que constituía detrimentos de la apertura numérica efectiva y por tanto de la resolución de las imágenes recuperadas.

Finalmente, la **Figura 3-8** muestra los resultados de aplicar el método propuesto. Una cámara USB de 2596x1940 pixeles de 2.2 μm , elegida para replicar el sistema de registro reportado en [3], fue posicionada a 5.4 mm de la cintura de la iluminación producida por una AL acoplada a un diodo laser de 654 nm en la configuración propuesta. Un retículo de calibración para microscopio fue posicionado a 250 μm y 630 μm de la cintura para el registro de los hologramas observados en el panel (a) y (c) respectivamente, los cuales se ilustran acompañados de sus valores de magnificación y apertura numérica. A pesar de contar con una apertura de $0.58 \pm 0.010 mm$, medida con el método reportado en [118], la apertura numérica efectiva se reduce en función de las condiciones geométricas registro como se expresa en la eqn (2.4). Adicionalmente las reconstrucciones en panel (b) y (d) evidencian que la solución propuesta es válida para la recuperación de información con mínima distorsión.

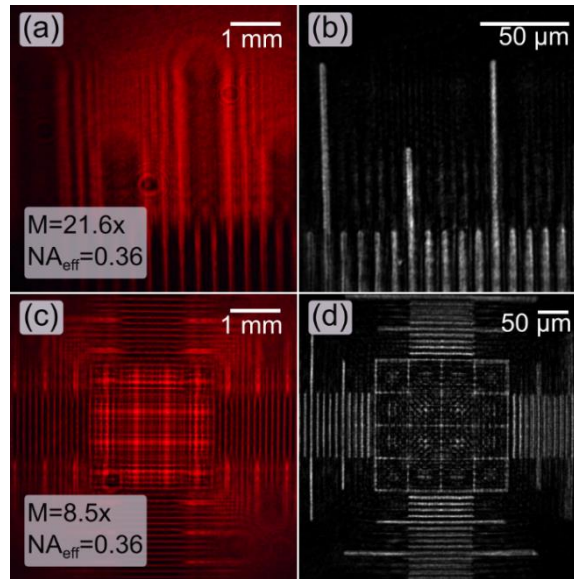


Figura 3-8: Hologramas en línea utilizando el método de corrección del diafragma y sus correspondientes reconstrucciones con diferente magnificación.

4. Prototipo de microscopio holográfico digital sin lentes certificable como OSH

4.1 Descripción del Hardware.

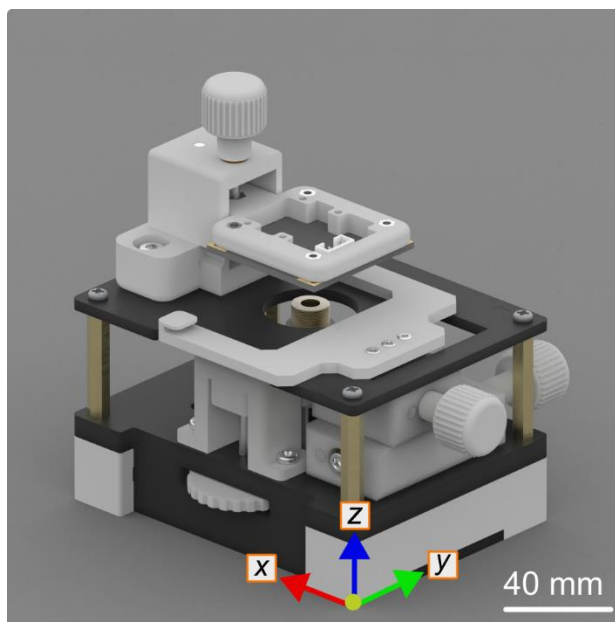


Figura 4-1: Prototipo de microscopio holográfico digital sin lentes certificable como OSH.

La **Figura 4-1** muestra el render del prototipo de DLHM propuesto en esta tesis. Las placas negras que componen la estructura principal están diseñadas fabricarse a través corte láser, mientras que las piezas blancas están diseñadas para ser manufacturadas mediante impresión 3D. Una lente esférica de bajo costo y un diodo láser de electrónica de consumo masivo son utilizados para implementar un sistema de iluminación como el descrito en la **Figura 3-7** panel (b). Una cámara digital de vigilancia de bajo costo de 5 megapíxeles es empleada como sistema de registro. Tanto la lente como la cámara se encuentran acopladas a sistemas de desplazamiento a lo largo del eje z . Estos sistemas permiten ajustar la distancia fuente-cámara y fuente-muestra con rangos de 12 mm y 13 mm, respectivamente. Un módulo de desplazamiento de la muestra se incorpora haciendo uso eficiente del espacio entre las placas negras, permitiendo el posicionamiento transversal del espécimen observado en el plano (x, y) . El volumen total del prototipo es de 95 mm x 120 mm x 115 mm, con un costo de materiales de \$63 USD, aproximadamente. Este capítulo condensa los módulos del diseño, sus descripciones, exigencias de adquisición y

fabricación, evaluación de requerimientos para ser considerado OSH y pruebas de desempeño del para la obtención de imágenes de muestras biológicas y no biológicas.

4.1.1 Sistema de Iluminación.

El diseño del módulo de iluminación, ilustrado en la **Figura 4-2**, está compuesto de dos subsistemas. Inicialmente, en el panel (a) se puede identificar el mecanismo que permite la reproducción del diseño óptico propuesto en la **Figura 3-7**. Un espejo de primera superficie (elemento ①) es utilizado para direccionar la iluminación producida por un módulo láser de bajo costo (elemento ②) hacia la lente esférica. El posicionamiento del diodo láser en el eje óptico del sistema se garantiza con una pieza de acople en ajuste (elemento ③), la cual se fija mediante tornillería al cuerpo del microscopio. El voltaje de alimentación del diodo es controlado mediante un circuito DC-DC comercial de referencia XL4005 (elemento ④), cuyo suministro eléctrico es proporcionado mediante de un puerto USB-C estándar (elemento ⑤).

En el panel (b) de la misma figura se observa el mecanismo de desplazamiento que permite posicionar axialmente el soporte de la lente esférica (elemento ⑥). El soporte se acopla a un elemento móvil (elemento ⑦) que cuenta con un rango de movimiento de 12 mm, y que se desliza respecto al elemento guía (elemento ⑧) que se une directamente al cuerpo del microscopio. El desplazamiento del elemento ⑦ es controlado mediante un mecanismo de tornillo-tuerca accionado por la rotación de una manivela (elemento ⑨) que se encuentra fija a un tornillo M3 de 35 mm de largo. Finalmente, una pieza que ingresa en ajuste al cuerpo de microscopio (elemento ⑩) cumple la función del diafragma 2 observado en **Figura 3-7** y permite circularizar el haz de luz redireccionado por el espejo. El rango de distancias fuente de iluminación muestra varía en este sistema de 1,5 mm a 10 mm aproximadamente.

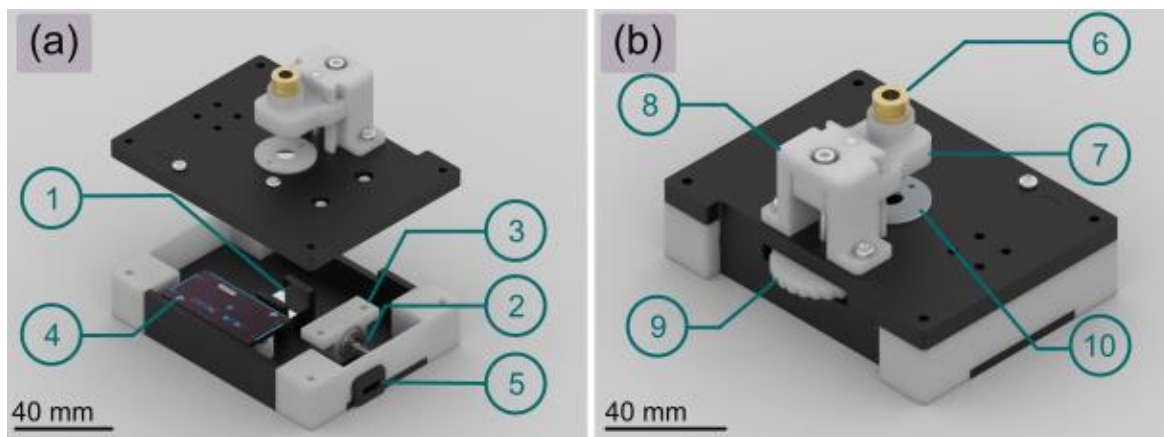


Figura 4-2: Modulo de Iluminación. El panel (a) ilustra el encapsulado de iluminación, donde un espejo ① es utilizado para redireccionar la iluminación producida por un diodo láser ② el cual se encuentra fijo al cuerpo ③ y es energizado por un módulo DC-DC ④ el cual es alimentado por un puerto USBC ⑤. En el panel (b) se ilustra el sistema de posicionamiento del soporte de la lente esférica ⑥, el cual reposa sobre una pieza móvil ⑦ que se desliza respecto a una guía fija ⑧, con un movimiento controlado por una manivela ⑨ dispuesta en el lateral del diseño.

4.1.2 Sistema de Registro.

El módulo de registro ilustrado en la **Figura 4-3** está compuesto por una manivela (elemento ①) para controlar el movimiento, un soporte móvil (elemento ②) para un sensor digital (elemento ③) y un sistema de guía de movimiento (elementos ④ y ⑤). En conjunto, este módulo permite un rango de desplazamiento de 13 mm para la cámara en la dirección z . El módulo se integra al cuerpo principal del microscopio haciendo uso de dos tornillos M4 de 12 mm de largo ubicados en los costados de la pieza ⑤. Como se puede observar en la **Figura 4-1**, el módulo de iluminación se apoya por completo sobre las placas del microscopio. Los tornillos de acople permiten alinear manualmente el sistema de registro con el eje óptico, evitando el uso de manipuladores en la dirección transversal (x, y) y simplificando el diseño respecto a los desarrollos previos del GODP reportados en [3]. El rango de distancias cámara a muestra permitidos en este esquema varía de 1 mm a 17,5 mm aproximadamente.

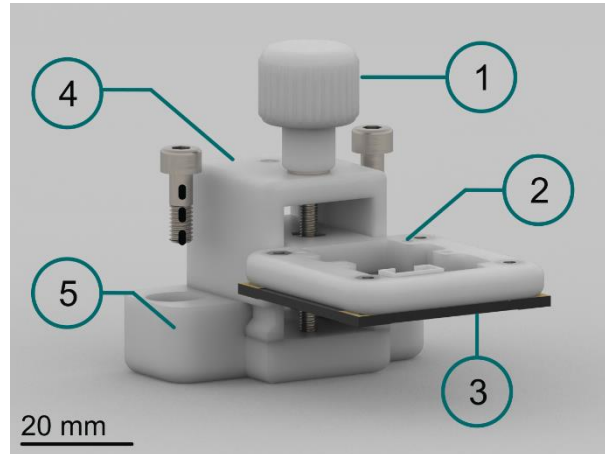


Figura 4-3: Sistema de registro. Compuesto por una manivela ① que controla el movimiento en z , un soporte para el sistema de registro ②, una cámara USB de 5 megapíxeles ③ y un sistema fijo que se compone de dos piezas ④ y ⑤.

4.1.3 Desplazador de la muestra y cuerpo.

Como módulo final, el cuerpo del microscopio ilustrado en la **Figura 4-4**, permite la integración de los elementos constitutivos del prototipo. El panel (a) condensa el cuerpo ensamblado, el primer elemento de este módulo con que interactúa el usuario final del microscopio es el soporte para la muestra (elemento ①), el cual reposa sobre una placa diseñada para ser manufacturada a través de corte láser (elemento ②). Esta última se incorpora a otro par de placas (elemento ③) a través de separadores hexagonales de bronce M3 de 35 mm hembra-hembra. Adicionalmente se observan en esta vista dos manivelas sobresalen del cuerpo principal (elementos ④ y ⑤), las cuales permiten la manipulación de la muestra en el plano (x, y) .

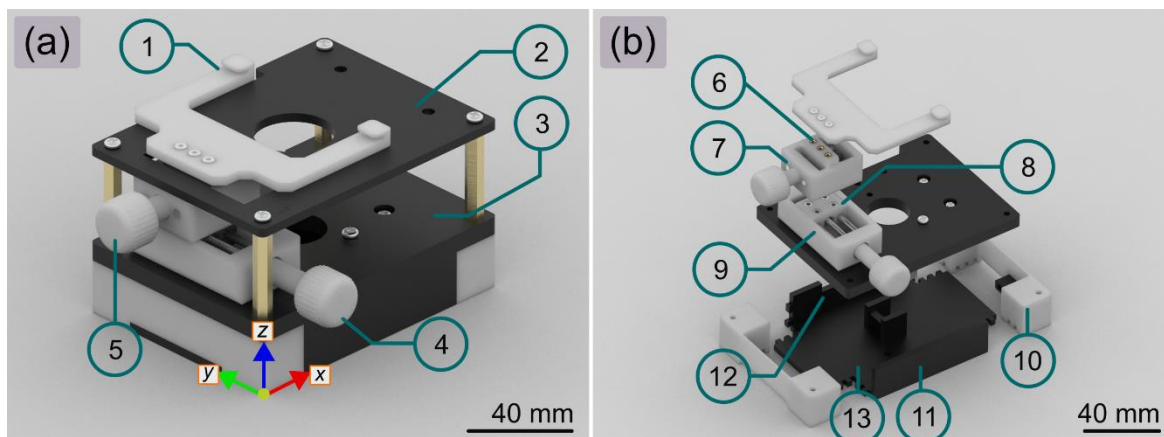


Figura 4-4: Cuerpo del microscopio. En el panel (a) se observa el cuerpo ensamblado mientras que en el panel (b) se observa explosionado del módulo inferior cuerpo. Las piezas observadas corresponden al soporte de la muestra ①, placas de soporte ② y base ③, manivelas de desplazamiento ④ y ⑤, elementos del desplazamiento lineal de la muestra ⑥, ⑦, ⑧ y ⑨ y tapas inferiores ⑩, ⑪, ⑫ y ⑬.

En el panel (b), el explosionado del cuerpo del microscopio es detallado; el soporte de la muestra (elemento ①) se acopla a desplazadores haciendo uso de tornillos M2 que lo fijan a una pieza móvil a lo largo del eje x (elemento ⑥) mediante un mecanismo tornillo-tuerca. Lo que permite que el soporte sea fácilmente reemplazado según las condiciones de la muestra observada. El posicionamiento de la muestra se logra mediante dos desplazadores lineales dispuestos perpendicularmente. El primero está compuesto por las piezas ⑥ y ⑦ que me permiten un movimiento a lo largo del eje x de 12 mm; este conjunto se integra a un desplazador lineal y compuesto por las piezas ⑧ y ⑨, el cual permite un desplazamiento de 20 mm. La pieza ⑨ se fija directamente al cuerpo del microscopio acoplando todo el sistema de desplazamiento de la muestra mediante 4 tuercas y tornillos M3.

Finalmente, en el panel (b) se observan las piezas que constituyen el encapsulado de la base. Cuatro tapas laterales (elementos ⑩, ⑪ y ⑫) y dos placas base (elementos ③ y ⑬) se unen entre sí mediante pegamento de secado rápido convencional. Este encapsulado se conecta a la placa de apoyo del desplazador de la muestra a través de los separadores hexagonales y tornillos de sujeción. El sistema descrito consolida un cuerpo de microscopio robusto, encapsulado y modular que protege el sistema de iluminación de

posibles influencias mecánicas externas y condiciones ambientales a la vez que aprovecha el espacio entre placa para integrar de forma interna el sistema de desplazamiento de la muestra. Todas las instrucciones de ensamble y acople entre piezas pueden encontrarse en el **Anexo B y C** los cuales contienen el plano detallado del microscopio y los pasos ensamble del prototipo respectivamente.

4.2 Cumplimiento de condiciones OSH.

La **Tabla 4-1** justifica el cumplimiento de requerimientos necesarios para certificar el prototipo diseñado como OSH de acuerdo con las definiciones de OSHA. Como se mencionó previamente en esta tesis de Ingeniería Física, el estado de normativa Nacional aún no define un camino claro para el licenciamiento libre. Es la Universidad quien una vez culminado el proceso de formación condensado en esta tesis definirá el alcance de licenciamiento, distribución y atribución de obras derivadas de los productos desarrollados. Respecto a los aspectos relacionados con manufactura y ensamble, no se requiere de infraestructura especializada o habilidades técnicas avanzadas para la construcción y operación del microscopio. Adicionalmente al ser alimentado por un puerto USB, solo se requiere un ordenador portátil tanto para energizarlo como para adquirir y procesar datos con el microscopio. Las características descritas consolidan el diseño propuesto como una alternativa con alto potencialidad de portabilidad para la observación de muestras en entornos no controlados.

Tabla 4-1: Cumplimiento de requisitos OSH del prototipo propuesto.

| Requisitos para una Licencia OSH | |
|---|--|
| Definición | Calificación |
| Documentación. | Cumple. Los archivos de diseño y la información necesaria para fabricación se dispondrán en los repositorios institucionales del grupo de investigación y complementarán los Anexos B y C de esta tesis. |
| Alcance | Cumple. Es definido por la Universidad. |
| Software necesario | Cumple. |
| Obras Derivadas | Cumple. |
| Libre de Distribución | Cumple. La Universidad al ser titular de los derechos patrimoniales define las condiciones de distribución. |
| Atribución | Cumple. La Universidad al ser titular de los derechos patrimoniales define las condiciones de distribución. |
| No Discriminación | Cumple. |

4.2.1 Materiales: Adquisición, métodos y costos de fabricación.

El **Anexo B** de esta tesis presenta el plano explosionado de ensamble del prototipo propuesto. La información detallada de todas las piezas del plano se encuentra en el **Anexo C**. Este último condensa los materiales, métodos de fabricación y enlaces de compra para las piezas comerciales que constituyen el prototipo; para las piezas destinadas a impresión 3D, el **Anexo C** condensa los links de los archivos CAD editables en su versión ".step". Ambos anexos constituyen la información necesaria para la fabricación, el ensamble y la modificación del prototipo. Las piezas en su versión editable se encuentran depositadas en el repositorio de Open-Sicence-Framework del GODP [119]. Una vez definido el mecanismo de licenciamiento por parte de la universidad dicho repositorio se complementará con material gráfico que soporte el proceso de ensamble y operación del microscopio.

4.2.2 Infraestructura: Cumplimiento de Normativa Ambiental y de manufactura.

La fabricación del prototipo no implica la manipulación de residuos peligrosos ni potencialmente nocivos para el ser humano o el medio ambiente. Toda vez que las piezas no comerciales están diseñadas para impresión 3D de deposición de filamento, no hay una norma que indique consideraciones espaciales para su fabricación. Las impresoras 3D

comúnmente cuentan con volúmenes inferiores a los $40 \times 40 \times 40 \text{cm}^3$ y no requieren de acondicionamiento eléctrico especial, por lo cual son compatibles con las normativas IEC 60950-1+A1+A2; EN60950-1, EN12100-1, EN60204-1 y EN1010.

Debido a que el microscopio hace uso de diodos láser de baja potencia, la resolución 33767 de 2016 no genera restricciones sobre la adquisición de la fuente de iluminación. No dirigir el láser directamente a los ojos y demás consideraciones de seguridad estándar deben estar presentes al manipular el microscopio. Finalmente, la única normativa legal que aplica al diseño corresponde a la disposición de las placas electrónicas del diodo láser, la cámara y el módulo XL4005, regulados por la resolución 0851 de 2022.

4.3 Desempeño del prototipo.

Una vez construido un modelo del prototipo, el cual se observa en **Figura 4-5**, este fue puesto a prueba utilizando muestras calibradas y muestras biológicas, tanto en entornos controlados como en entornos no controlados. Los registros presentados en esta sección son generados utilizando un diodo láser de 654 nm y una cámara de vigilancia de 2590×1949 pixeles de $2,2 \mu\text{m}$ de lado. Todas las reconstrucciones fueron realizadas utilizando el plugin OSH para ImageJ previamente presentado [5].

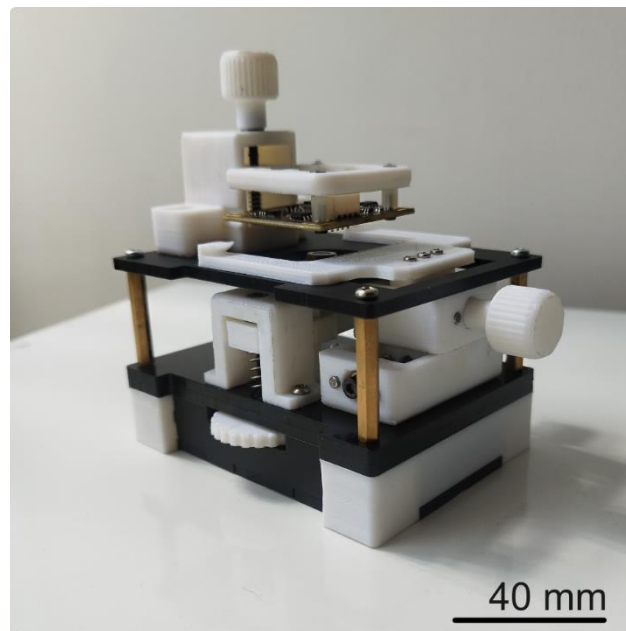


Figura 4-5: Prototipo Fabricado.

4.3.1 Pruebas en entornos Controlados.

La **Figura 4-6** muestra el desempeño del prototipo en un entorno controlado. El laboratorio del Grupo de Optica y Procesamiento Opto-Digital de la Universidad Nacional de Colombia fue el sitio utilizado. Los paneles (a) y (b) muestran el holograma de una muestra de calibración tipo USAF 1951 y su correspondiente referencia. Para su observación se posicionó la muestra a 0,8 mm aproximadamente de la fuente puntual y se fijó una distancia fuente-cámara de 6 mm. La reconstrucción observada en el panel (c) evidencia la capacidad de resolución alcanzada corresponde al elemento 5 del grupo 8 resaltada en el rectángulo morado. La capacidad de resolución de este desarrollo representa una mejora significativa respecto a los prototipos de DLHM reportados por el GODP [3] donde las observaciones se limitaban al elemento 3 del grupo 7, lo cual corresponde al área limitada por el rectángulo azul en el panel (c). Como se mencionó previamente la posibilidad de magnificar el patrón de difracción sin necesidad de sacrificar la apertura numérica efectiva influye directamente en el aumento de capacidad de resolución del prototipo propuesto, el cual a diferencia de los prototipos previamente desarrollados por el GODP depende únicamente del aumento de L , lo que evita detrimento de la NA efectiva y por tanto de la resolución.

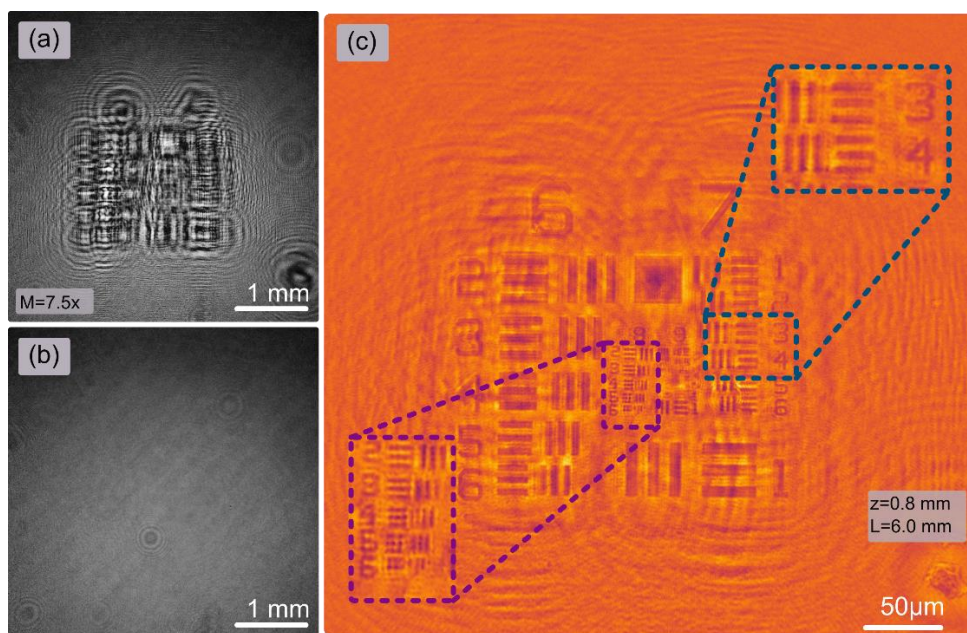


Figura 4-6: Pruebas en Entorno Controlado USAF 1951. El panel (a) muestra el holograma registrado con el prototipo producido por la iluminación registrada en el panel (b), el panel

(c) muestra la reconstrucción en fase de (a) evidenciando una capacidad de resolución del elemento 5 del grupo 8.

4.3.2 Pruebas en entornos no controlados.

Las pruebas en entornos no controlados se realizaron en un escritorio de trabajo en una habitación convencional. Las condiciones de operación de 25°C de temperatura ambiente y una humedad relativa del 80%, corresponden a las condiciones ambientales promedio de Envigado – Antioquia donde fue probado el prototipo.

La **Figura 4-7** muestra el desempeño del prototipo propuesto en la observación de una muestra de retículos calibrada para microscopio. La distancia fuente-muestra para ambas observaciones corresponde a 0.64 mm aproximadamente, mientras que la distancia fuente cámara corresponde a 7 mm para el panel (a) y 6.4 mm aproximadamente para el panel (b). Los paneles (c) y (d) muestran las reconstrucciones en intensidad respectivamente del panel (a) y del panel (b).

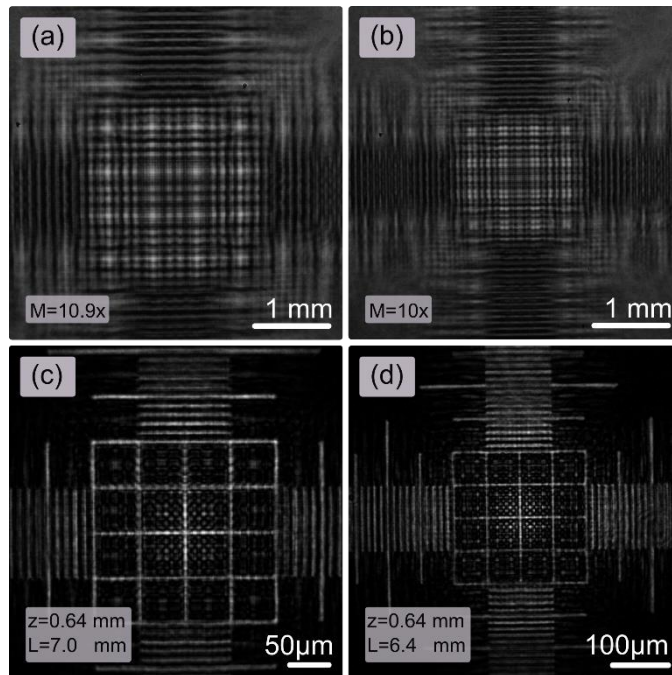


Figura 4-7: Pruebas de calibración en entorno no controlado. El panel (a) y (b) muestran registros de calibración utilizando el prototipo propuesto para diferentes distancias fuente muestra. Los paneles (c) y (d) muestran las correspondientes reconstrucciones de intensidad.

La **Figura 4-8** condensa el desempeño del prototipo propuesto para la observación de muestras biológicas de amplitud en entornos no controlados. El holograma de la pierna de un insecto y su correspondiente reconstrucción se observan en los paneles (a) y (b) respectivamente. Mientras que el holograma de una *gramínea* y su reconstrucción se observan en el panel (c) y (d).

Adicionalmente el prototipo propuesto fue validado en un entorno no controlado para la observación de muestras transparentes. La **Figura 4-9** muestra el desempeño del prototipo para la obtención de imágenes de células epiteliales bucales panel (a) y (b) y de extendidos de sangre (c) y (d).

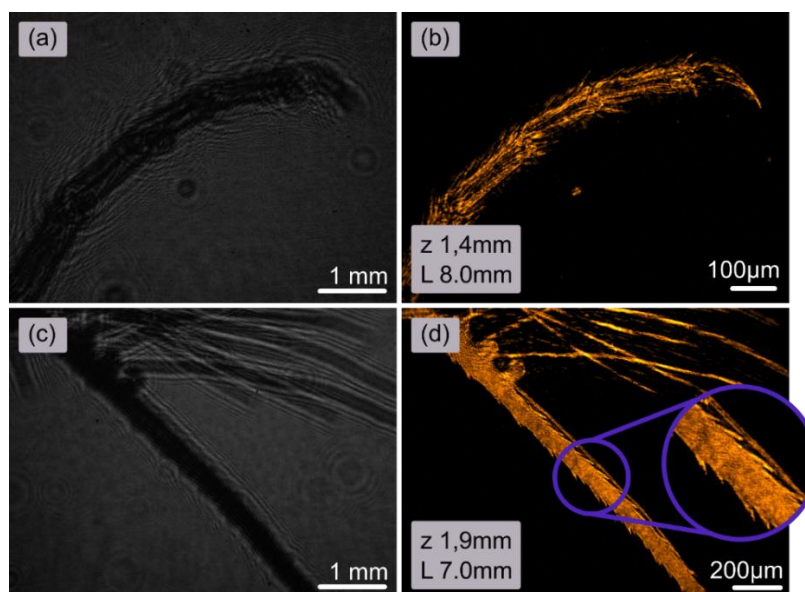


Figura 4-8: Validación de prototipo propuesto en la observación de muestras de amplitud. El panel (a) y (b) muestran el holograma y la reconstrucción intensidad de una pierna de insecto. El panel (c) y (d) muestran el holograma y la reconstrucción de intensidad de la espiga de una *gramínea*.

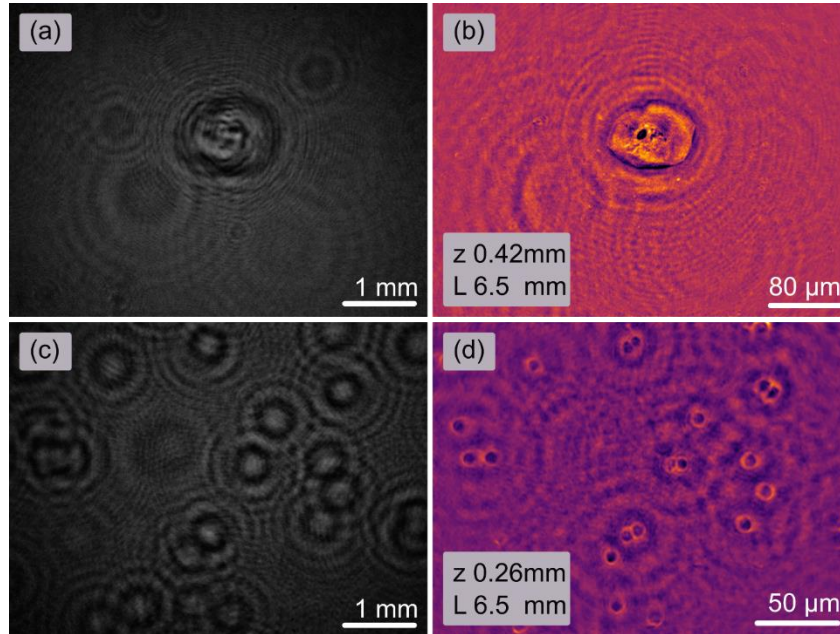


Figura 4-9: Validación de prototipo propuesto en la observación de muestras de fase. El panel (a) y (b) muestran el holograma y la reconstrucción fase de células epiteliales bucales. El panel (c) y (d) muestran el holograma y la reconstrucción de fase de un extendido delgado de sangre.

4.3.3 Pruebas en entornos relevantes.

Como prueba final, el prototipo construido fue sometido a una validación en un entorno relevante no controlado. El laboratorio del grupo de investigación Malaria de la Universidad de Antioquia fue utilizado como sitio de prueba. El objetivo de esta tarea fue recoger apreciaciones de un par evaluador respecto al desempeño del prototipo, las cuales se consolidan en la **Tabla 4-2** y se agrupan en torno a la usabilidad y la eficiencia del prototipo.

En términos generales las calificaciones son positivas, no representan cambios significativos al diseño en términos de redefinición de piezas. Sin embargo, dejan en evidencia la necesidad de avanzar en la integración de modelos de auto-enfoque y reconstrucción automática en DLHM de modo que se oriente la observación del usuario final únicamente a la imagen reconstruida de espécimen en estudio.

Tabla 4-2: Recomendaciones de desempeño.

| Atributo | Sub-atributo | Tipo | Descripción | Observaciones |
|------------------|-------------------|------------|--|--|
| Eficiente | Recursos | Tangible | Necesidad de recursos adicionales para su uso | El par evaluador reconoce el uso de un puerto USB convencional como medio de suministro eléctrico como una característica novedosa que escala su portabilidad. |
| | Tiempo | Intangible | Tiempo necesario para capturar y procesar un registro | El par evaluador indica como potencial dificultad el tiempo de espera necesario para el procesamiento de los hologramas. Como usuarios de microscopía óptica, no están familiarizados con técnicas de formación de imagen que demanden un posprocesamiento digital visible al usuario. Se hace necesario incrementar la velocidad de procesamiento y entregar al usuario reconstrucciones directas en lugar de los registros holográficos. |
| Usable | Fácil de Aprender | Intangible | Fácil de aprender a través de un manual claro y breve. | El par evaluador sugiere integrar distintivos visuales a las piezas del microscopio que están destinadas a ser manipuladas por el usuario final. Para ello, sugiere implementar codificación de colores y marcación de las manivelas de los desplazadores. |
| | Operable | Intangible | Facilidad de uso (después de haber aprendido) | El par evaluador manifiesta que el dispositivo es, en general, fácil de operar. Sin embargo, reitera la dificultad de inspección de la muestra al analizar los registros holográficos. Como el usuario final no tiene un entrenamiento especializado en el uso de sistemas de holografía, es necesario que se le presente directamente la imagen de reconstrucción en lugar del registro holográfico. |
| | Atractivo | Intangible | "Que el microscopio no produzca miedo" y "Que invite a ser manipulado" | El par evaluador destaca el atractivo estético del prototipo, tanto en su forma como en la combinación de colores de las piezas externas. Sin embargo, recomienda que los elementos destinados a manipulación directa no sean blancos para reducir la apariencia de deterioro con el uso en diferentes condiciones de higiene del usuario y de las muestras. El par evaluador sugiere proteger los componentes electrónicos de la cámara y su cable de conexión en un encapsulado. Esto permitiría protegerlos de las condiciones ambientales de uso en campo, y previene la posibilidad de interacción accidental del usuario con los componentes electrónicos. De igual manera, recomienda aislar o encapsular la zona interna del microscopio para evitar acumulación de polvo o contaminantes que afecten su operación. |

4.3.4 Madurez tecnológica del microscopio diseñado.

La escala de madurez tecnológica, TRL por sus siglas en inglés, determina el nivel de alcance de un desarrollo industrial [120]. La **Tabla 4-3** indica la calificación de TRL del prototipo propuesto. Las figuras **Figura 4-8** y **Figura 4-9** demuestran el desempeño del prototipo en ambientes no controlados, evidencian una correcta integración de los módulos y en conjunto con los cumplimientos de normativa ambiental permiten sin ninguna duda definir la escala de madurez tecnológica del prototipo propuesto.

Tabla 4-3: Cumplimiento de TRL. Según Normativa UNAL, basado en [120].



| | | | |
|---|--|------------|---|
| TRL5: Desarrollo Tecnológico. Tecnología validada en laboratorio, pero en condiciones de un entorno relevante (condiciones que simulan condiciones existentes en un entorno real). La integración de los componentes empieza a ser de alta confiabilidad. Para el caso de plataformas tecnológicas, el ambiente relevante debe considerar condiciones industriales, no de laboratorio experimental académico. Proceso de planeación del negocio | | | |
| TRL 5: Desarrollo a escala real. Validación de los sistemas, subsistemas o componentes en un entorno relevante (o industrialmente relevante en caso de tecnologías habilitadoras clave). Los elementos básicos de determinada tecnología son integrados de manera que la configuración final es similar a su aplicación final, es decir que está listo para ser usado en la simulación de un entorno real, por lo que se mejoran los modelos tanto técnicos como económicos del diseño inicial, se ha identificado adicionalmente aspectos de seguridad, limitaciones ambientales y/o regulatorios entre otros. Sin embargo, la operatividad del sistema y tecnologías ocurre todavía a nivel de laboratorio. La principal diferencia entre el nivel 4 y 5 es el incremento en la fidelidad del sistema y su ambiente hacia la aplicación final. | | | |
| 1 | ¿Ha probado su prototipo a una escala mayor que laboratorio? | Culminado | Ver Figura 4-8 y Figura 4-9 |
| 2 | ¿Tiene plenamente identificadas y considerados aspectos involucrados en la producción a una escala mayor de laboratorio (costos de materias primas, equipos, adecuaciones de infraestructura, costos energéticos)? | Culminado. | Capítulo 4.21 y 4.22. |
| 3 | ¿El prototipo cumple con las normas y/o previsiones legales o del medio ambiente del sector? | Culminado. | Capítulo 4.22. |

4.4 Potencialidades del prototipo propuesto.

4.4.1 Enseñanza.

Como parte del proceso de transferencia tecnológica e identificación de usuarios potenciales de la tecnología desarrollada y de la generación de OSK, en esta tesis el microscopio diseñado se propone como una herramienta educativa para estudiar la teoría de la difracción. El prototipo se incorpora al proceso de enseñanza como un elemento que proporciona validaciones experimentales de los fenómenos de difracción comúnmente estudiados por estudiantes de pregrado. Los pasos de registro y reconstrucción de DLHM ayudan a los alumnos a apropiarse de la bidireccionalidad de los fenómenos de difracción desde un enfoque completamente práctico.

Toda la información asociada a esta propuesta constituye dos contribuciones en el marco de la conferencia internacional *Education and Training in Optics and Photonics* que condensan en dos procedigns publicados en SPIE digital library [121] y [122], los cuales son anexados al final de esta tesis.

| | |
|---|--|
|  | Introduction to holography at undergraduate level using research-grade open-source software. [121] |
|  | Beyond maxima and minima: a hands-on approach for undergraduate teaching of diffraction. [122] |

Las ideas publicadas en [121] y [122] se implementaron en un taller de holografía de dos etapas en el marco del “*10th International Symposium "Optics & its applications"* dictado en la ciudad de Santiago de Cali – Valle. En la primera etapa, las ideas condensadas en [107] introducen a los estudiantes a la holografía desde un entorno digital, y en la segunda etapa, la propuesta publicada en [108] se implementa mediante el uso del prototipo desarrollado.

Para la segunda etapa del taller se construyeron 7 unidades del prototipo propuesto sin el módulo del desplazador de la muestra. Las condiciones de operación para estos elementos

fueron temperaturas promedio de 32 °C no controladas y humedad relativa de 52 %, las cuales no representaron un detrimento en el desempeño del prototipo evaluado. La **Figura 4-10** muestra el registro digital de la experiencia del taller, donde los estudiantes preparaban muestras de células epiteliales panel (a), que eran posteriormente observadas como se muestra en el panel (b). Finalmente, en el panel (c) se muestra como la versatilidad del prototipo permitía a los estudiantes a observar bajo el microscopio elementos adicionales a los preparados para el taller como las lentes de sus anteojos.

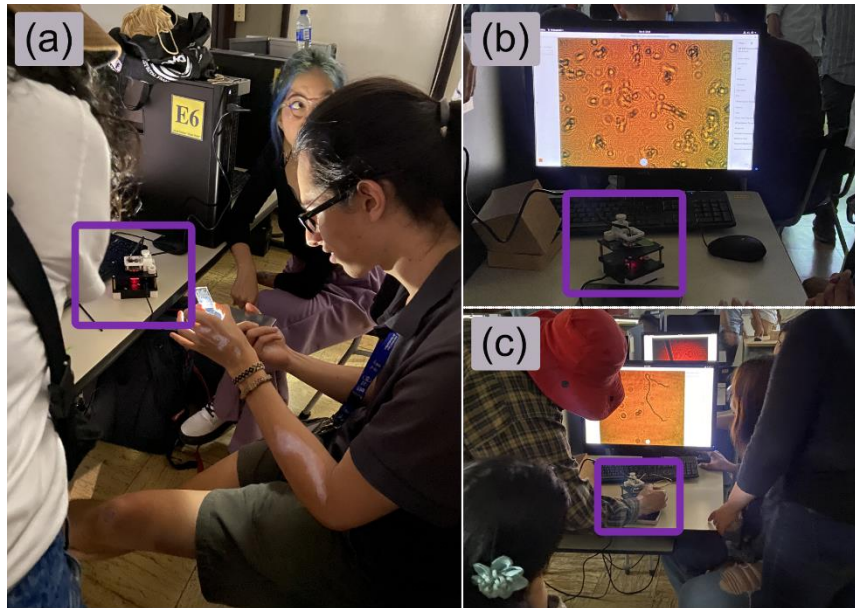



Figura 4-10: Taller de holografía, Santiago de Cali. En el panel (a) se observan estudiantes preparando muestras de células epiteliales bucales, cuyo holograma se observa en el panel (b), adicionalmente se muestra cómo se observa la superficie de la lente de uno de los anteojos de los estudiantes en el panel (c).

4.4.2 Futuras integraciones con modelos de inteligencia artificial.

Al DLHM ser una técnica de formación de imágenes de luz coherente de dos pasos, su usabilidad es comúnmente obstaculizada por la necesidad de post-procesamiento de los registros holográficos y por la calidad de las imágenes obtenidas. Este problema no es ajeno a la integración de soluciones de inteligencia artificial (IA) y aprendizaje automático (ML) [123–126]. No obstante, el desarrollo de modelos de IA y ML que resuelvan los problemas previamente mencionados está directamente limitado por la calidad y alcance de la base de datos empleada en su construcción y a la fecha no se cuenta con bases de

datos de alta calidad de permitan el desarrollo de modelos robustos que se puedan generalizar para su implementación en DLHM [124].

En el desarrollo de esta tesis, se construyó un conjunto de datos de alta calidad de registros y datos de reconstrucción DLHM. La base de datos está constituida por hologramas de múltiples valores de apertura numérica efectiva, para los cuales la distancia entre la fuente-muestra, y la longitud de onda de iluminación son variados. La base de datos final está compuesta por 11.720 hologramas de muestras biológicas y no biológicas, y constituyó una ponencia en la Reunión Iberoamericana de óptica en su versión del año 2023. La base de datos construida, de forma parcial, ya ha sido utilizada en la construcción de conocimiento colaborativo para el desarrollo modelos de ML con el fin de generar modelos de autoenfoco en DLHM [127]. El abstract aceptado de la ponencia es adjuntado al final de esta tesis.

| | |
|---|---|
|  | High-quality open-source dataset of Digital Lensless Holographic Microscopy recordings and reconstructions. |
|---|---|

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En esta tesis de Maestría en Ingeniería Física se han consolidado los desarrollos necesarios para el diseño y construcción de un prototipo de microscopio holográfico digital sin lentes certificable como Open-Source hardware (OSH).

Para ello se realizó un levantamiento del panorama internacional entorno al OSH, lo que permitió identificar los esquemas de licenciamiento abierto como el requerimiento clave asociado a las características del OSH. Una vez levantado el panorama internacional se identificaron, en términos legales, las condiciones definidas por el plan nacional de ciencia abierta y el plan nacional de desarrollo para la producción OSH en Colombia.

Finalmente, en términos de características necesarias para la certificación OSH se tomaron como referencia las métricas definidas por The Open Source Hardware Association (OSHWA), organización que es reconocida por UNESCO y por la DIN como ente regulador en términos de certificación OSH. Teniendo en cuenta las métricas definidas por OSHWA para el desarrollo de OSH, se han estudiado los diferentes elementos constitutivos de DLHM desarrollados por el ODP proyectando su integración a un prototipo certificable como OSH.

Se encontró que tanto el software necesario para la reconstrucción de DLHM desarrollado por el GODP, como los sensores de imagen necesarios para sistema de registro digital no representan incompatibilidades con las métricas definidas por OSHWA y que el desarrollo se debía centrar en la fuente de iluminación.

Debido a la importancia de la apertura numérica en el desempeño de DLHM se propuso un método para la medición automática de la apertura numérica, el cual minimiza los errores introducidos por el usuario en el proceso de medición. El método se validó con distintos elementos calibrados resultando en errores relativos menores al 3% en la medida de la apertura numérica.

Se diseñó, construyó y validó un prototipo OSH para fabricación de fibras ópticas de punta cónica (COFT) como fuentes de iluminación en DLHM. El prototipo propuesto permitió estandarizar la fabricación de múltiples fibras con desviaciones menores a 2° en el ángulo de los conos fabricados. A pesar del alto desempeño de las COFT estas fueron descartadas como elementos constitutivos de un prototipo OSH debido a la regulación legal de los reactivos utilizados en su fabricación.

Adicionalmente, en esta tesis se presentó por primera vez el uso de las lentes difractivas de alta apertura numérica, incluidas en los lectores de Blu-Ray (OPU por sus siglas en inglés) como fuente de iluminación para DLHM. El uso de los OPU consolidó, a partir de un proceso de ingeniería inversa, el diseño y construcción de un módulo electrónico de control que permite la implementación de los OPU como fuente de triple longitud de onda en DLHM. Se evaluó el desempeño de los OPU y se identificó su alto potencial en montajes de laboratorio, sin embargo, se descartó su integración a un prototipo OSH debido a la demanda de filtros espaciales necesarios el uso de las lentes difractivas.

En términos de la iluminación, las lentes esféricas convencionales fueron identificadas como el único elemento que no encuentra incompatibilidades directas con las métricas OSH definidas por OSHA. Se propuso un esquema para la integración de lentes esféricas y diodos láser de bajo costo. El esquema de iluminación propuesto permitió alcanzar magnificaciones del patrón de difracción 15 mayores que en los prototipos previamente reportados por el GODP sin afectar la resolución del sistema.

Finalmente, se diseñó y construyó un microscopio certificable como OSH. El microscopio diseñado es compatible con las definiciones de OSHA y puede ser manufacturado mediante técnicas de prototipado rápido como corte láser e impresión 3D. En el prototipo se integra el sistema de iluminación propuesto para lentes esféricas y fue validado tanto en entornos controlados como no controlados. La distancia fuente-muestra mínima es de 0.2 mm lo que permite una magnificación de los patrones de difracción respecto a los desarrollos previamente reportados por el GODP, eliminando la necesidad de alejar la cámara de la fuente y por tanto reducir la apertura numérica. El prototipo diseñado fue implementado tanto en entornos relevantes de laboratorio como en procesos de

educación. Soportados por las pruebas de desempeño realizadas el prototipo diseñado se calificó en la escala de madurez tecnológica TRL5.

Se diseñó un taller de dos etapas para la integración del prototipo como elemento de proceso de aprendizaje de difracción. Finalmente se realizó un proceso de evaluación en entornos relevante no controlado con el grupo de investigación Malaria de la Universidad de Antioquia. El par evaluador calificó positivamente la estética y el nivel de portabilidad del prototipo desarrollado. El par evaluador identificó como una dificultad para los posibles usuarios de ciencia de la vida el proceso de reconstrucción y sugirió avances en la integración de software de reconstrucción automática a ratas de video al dispositivo. En este sentido la última contribución de esta tesis se consolidó en el levantamiento de una base de datos de alta calidad de 11720 hologramas que ya ha sido utilizada parcialmente como insumo para la construcción de modelos de auto-enfoque para DLHM soportados por inteligencia artificial.

5.2 Recomendaciones

Para futuros trabajos y escalamiento industrial del prototipo, alejado de la filosofía OSH, se recomienda el estudio de fabricación CNC y modelos de inyección de plástico, ambos están disponibles vía web de la mano de diversos proveedores. La versatilidad del prototipo permite la integración de iluminadores RGB en el encapsulado y la integración polarizadores en el camino óptico previo a la lente esférica, lo cual permite a futuro evaluar diferentes metodologías para el uso del prototipo.

A. Anexo: Manuscritos y productos.

Al final de esta tesis se anexan los documentos correspondientes a los manuscritos y productos asociados a lo largo del documento. El orden de los documentos se lista a continuación:

- Automatic method to measure the numerical aperture of a propagating Gaussian light beam.
- Método automático para la medición de la apertura numérica de haces de luz Gaussianos.
- Cost-effective and 3D printable dip-etching device for cone-shaped optical fiber tip fabrication.
- 3D printable open-source hardware for conical-shaped optical fiber tip fabrication.
- Adapting a Blu-ray Optical Pickup Unit as a Point Source for Digital Lensless Holographic Microscopy.
- Digital Lensless holographic microscopy based on an optical pick-up unit.
- Cost-effective, DIY and open-source digital lensless holographic microscopy with astigmatism correction and aberration reduction.
- Introduction to holography at undergraduate level using research-grade open-source software.
- Beyond maxima and minima: a hands-on approach for undergraduate teaching of diffraction.
- High-quality open-source dataset of Digital Lensless Holographic Microscopy recordings and reconstructions.

B. Anexo: Plano de despiezado del prototipo diseñado.

Al final de esta tesis, posterior a los documentos asociados con los productos de investigación, se anexa el plano de despiezado del prototipo diseñado. La descripción de las piezas, sus materiales y métodos de manufactura se condensan en la tabla del Anexo C.

C. Anexo: Tabla de piezas y materiales

La presente tabla integra todos los elementos necesarios para la construcción de prototipo DLHM OSH desarrollado, es acompañada de un link que indica, para los elementos comerciales su lugar de adquisición y para los diseños CAD de impresión 3D su lugar de descarga. El costo total de los elementos necesarios para la fabricación del prototipo propuesto es de 63 dólares aproximadamente.

| Ref. | Nombre | Tipo | Unds. | Material | Costo (USD) | Link |
|------|-------------------------------|--------------|-------|----------------|-------------|---|
| 1 | 04_Recording_Handler | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,06 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 2 | 02_Recording_Z_Guide_Vertical | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,12 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 3 | 01_Recording_CameraHolder | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,12 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 4 | 03_Recording_Z_Guide_Base | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,16 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 5 | 05_Recording_Camera | Comercial | 1 | N/A | 48 | https://es.aliexpress.com/item/1005005753954917.html |
| 6 | 03_Body_Sample_Shield | Corte láser | 1 | Acrílico o MDF | 0,2 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 7 | 06_AP_Female_Spacer_M3x35 | Comercial | 4 | Bronce | 0,8 | https://es.aliexpress.com/item/4000239735518.html |
| 8 | 01_Body_Illumination_Shield1 | Corte láser | 1 | Acrílico o MDF | 0,2 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 9 | 02_Body_Illumination_Shield2 | Corte láser | 1 | Acrílico o MDF | 0,2 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |

| | | | | | | |
|----|--------------------------------------|--------------|---|----------------|------|---|
| 10 | 06_Body_Lateral_Shield | Corte láser | 1 | Acrílico o MDF | 0,2 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 11 | 05_Body_SampleHandler_Lateral_Shield | Corte láser | 1 | Acrílico o MDF | 0,2 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 12 | 09_Body_3D_LateralShield1 | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,14 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 13 | 10_Body_3D_LateralShield2 | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,14 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 14 | 04_Body_Mirror_LateralHolder | Corte láser | 2 | Acrílico o MDF | 0,2 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 15 | 08_Body_Mirror_Support | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,06 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 16 | 07_Body_Laser_Holder | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,06 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 17 | 07_AP_Laser | Comercial | 1 | N/A | 1,7 | https://es.aliexpress.com/item/1005005275584861.html |
| 18 | 00_AP_XL4005 | Comercial | 1 | N/A | 0,8 | https://es.aliexpress.com/item/32896699470.html |
| 19 | 00_Body_BaseShield | Corte láser | 1 | Acrílico o MDF | 0,2 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 20 | 01_AP_Illumination_Handler | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,04 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 21 | 08_AP_Bearing10mm | Comercial | 1 | Acero | 0,2 | https://es.aliexpress.com/item/1005004891710860.html |
| 22 | 03_Illumination_Z_Guide | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,12 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 23 | 01_Illumination_Lens_Holder | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,1 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 24 | 06_Illumination_Lens_Holder | Comercial | 1 | Bronce | 0,75 | https://es.aliexpress.com/item/4000290365471.html |
| 25 | 01_Stage_Y_Axis_p1 | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,2 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |

| | | | | | | |
|----|------------------------------|--------------|---|--------|-------|---|
| 26 | 02_Stage_Y_Axis_p2 | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,06 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 27 | 03_Stage_Axis_3mmx50 | Comercial | 2 | Acero | 0,3 | https://es.aliexpress.com/item/4000176913597.html |
| 28 | 14_AP_Screw_M3x50 | Comercial | 1 | Acero | 0,2 | https://es.aliexpress.com/item/1005003868256258.html |
| 29 | 09_Stage_Y_Axis_Handler | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,06 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 30 | 04_Stage_X_Axis_p1 | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,12 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 31 | 05_Stage_X_Axis_p2 | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,06 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 32 | 06_Stage_Axis_3mmx30 | Comercial | 4 | Acero | 0,6 | https://es.aliexpress.com/item/4000176913597.html |
| 33 | 08_Stage_X_Axis_Handle | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,06 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 34 | 10_AP_ThreadedInsert_M2 | Comercial | 3 | Bronce | 0,13 | https://es.aliexpress.com/item/1005004535859664.html |
| 35 | 07_Stage_Sample_Holder_V3 | Impresión 3D | 1 | PLA | 0,12 | https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe |
| 36 | 17_AP_Screw_M2x4 | Comercial | 4 | Acero | 0,19 | https://es.aliexpress.com/item/617351435.html |
| 37 | 11_AP_Bearing_MF63zz Bearing | Comercial | 6 | Acero | 1,2 | https://es.aliexpress.com/item/1005004891710860.html |
| 38 | 12_AP_Screw_M3x8 | Comercial | 6 | Acero | 0,9 | https://es.aliexpress.com/item/617351435.html |
| 39 | 15_AP_Screw_M4x12 | Comercial | 2 | Acero | 0,068 | https://es.aliexpress.com/item/10000139502321.html |
| 40 | 16_AP_USBC_female | Comercial | 1 | N/A | 0,26 | https://es.aliexpress.com/item/1005005397091278.html |
| 41 | 09_AP_Screw_M2x8 | Impresión 3D | 7 | Acero | 0,25 | https://es.aliexpress.com/item/10000139502321.html |
| 42 | 02_AP_Screw_M3x35 | Comercial | 3 | Acero | 0,45 | https://es.aliexpress.com/item/617351435.html |

| | | | | | | |
|----|-------------------|-----------|----|-------|--------|---|
| 43 | 03_AP_Screw_M3x10 | Comercial | 12 | Acero | 1,8 | https://es.aliexpress.com/item/617351435.html |
| 44 | 04_AP_Nut_M2 | Comercial | 8 | Acero | 0,1328 | https://es.aliexpress.com/item/4000226223259.html |
| 45 | 05_AP_Nut_M3 | Comercial | 15 | Acero | 0,249 | https://es.aliexpress.com/item/4000226223259.html |
| 46 | Mirror | Comercial | 1 | Glass | 0.4 | https://es.aliexpress.com/item/1005004337941280.html |
| | | | | Total | 62,18 | |

D. Anexo: Computo del coeficiente esférico primario

Una lente esférica de Thorlabs 357610 [128], diseñada para 410 nm, fue empleada como referencia para el computo de la evolución del coeficiente esférico primario Z_s [129] a medida que se incrementa la distancia entre láser y lente como se propone en la **Figura 3-7 (b)**. El computo del coeficiente esférico primario fue calculado utilizando el software Optic Studio [130], para el caso ideal con una iluminación plana corresponde, como se observa en el panel (a) de la **Figura 5-1**, dicho corresponde a $1,93 \lambda$, a medida que nos alejamos según nos lo permiten las condiciones de diseño dicho coeficiente se reduce a un valor de $2,79 \lambda$ para los 80 mm a los que se ubica el láser de la fuente de iluminación, escenario ilustrado en el panel (b) de la **Figura 5-1**. En este punto el decrecimiento del coeficiente alcanza un valor asintótico como se observa en la **Figura 5-1 (c)**.

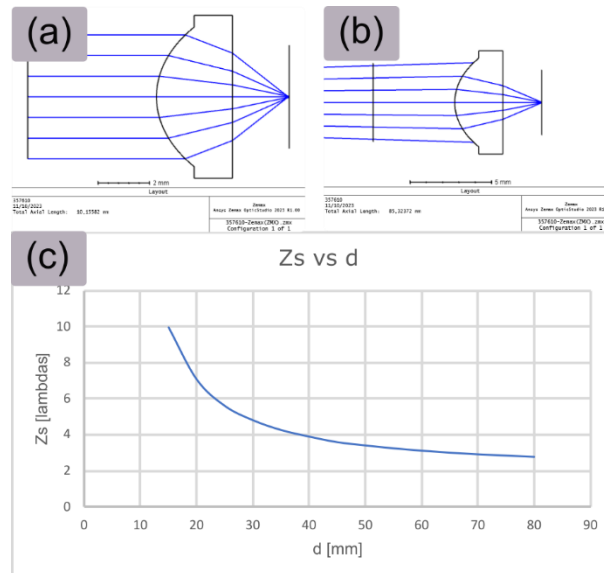


Figura 5-1: Evolución del coeficiente esférico primario Z_s .

Bibliografía

1. W. H. Organization, *Malaria Microscopy Quality Assurance Manual*, version 2 (World Health Organization, 2016).
2. E. Thomas and W. Albritton, "Office microscopy in the diagnosis of infectious diseases," *Can. Fam. Physician* **34**, 379–383 (1988).
3. H. Tobon-Maya, S. Zapata-Valencia, E. Zora-Guzmán, C. Buitrago-Duque, and J. Garcia-Sucerquia, "Open-source, cost-effective, portable, 3D-printed digital lensless holographic microscope," *Appl. Opt.* **60**, A205 (2021).
4. J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, P. Klages, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy," **45**, 836–850 (2006).
5. C. Trujillo, P. Piedrahita-Quintero, and J. Garcia-Sucerquia, "Digital lensless holographic microscopy: numerical simulation and reconstruction with ImageJ," *Appl. Opt.* **59**, 5788–5795 (2020).
6. Holmarc Opto-Mechatronics Ltd, "HO-DIHM-T01: Digital Inline Holography Microscope," <https://www.holmarc.com/dihm.php>.
7. N. L. Walcutt, B. Knörlein, I. Cetinić, Z. Ljubesic, S. Bosak, T. Sgouros, A. L. Montalbano, A. Neeley, S. Menden-Deuer, and M. M. Omand, "Assessment of holographic microscopy for quantifying marine particle size and concentration," *Limnol. Oceanogr. Methods* **18**, 516–530 (2020).
8. Y. Yue, X. Yu, X. You, Y. Wang, and D. Redmiles, "Ideology in Open Source Development," in *2021 IEEE/ACM 13th International Workshop on Cooperative and Human Aspects of Software Engineering (CHASE)* (2021), pp. 71–80.
9. J. T. Collins, J. Knapper, J. Stirling, J. Mduda, C. Mkindi, V. Mayagaya, G. A. Mwakajinga, P. T. Nyakyi, V. L. Sanga, D. Carbery, L. White, S. Dale, Z. J. Lim, J. J. Baumberg, P. Cicuta, S. McDermott, B. Vodenicharski, and R. Bowman, "Robotic microscopy for everyone: the OpenFlexure microscope," *Biomed. Opt. Express* **11**, 2447–2460 (2020).
10. J. A. Picazo-Bueno, K. Trindade, M. Sanz, and V. Micó, "Design, Calibration, and

- Application of a Robust, Cost-Effective, and High-Resolution Lensless Holographic Microscope," *Sensors* **22**, 553 (2022).
11. S. Amann, M. von Witzleben, Breuer, and Stefan, "3D-printable portable open-source platform for low-cost lens-less holographic cellular imaging," arXiv Prepr. arXiv1904.04497 (2019).
 12. UNESCO, *UNESCO Recommendation on Open Science* (2021).
 13. MINISTERIO DE TECNOLOGÍA CIENCIA E INNOVACION, *Política Nacional de Ciencia Abierta 2022-2031 Del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovacion* (2022), p. 85.
 14. B. Patiño-Jurado, J. F. Botero-Cadavid, and J. Garcia-Sucerquia, "Step-Index Optical Fibers With 0.88 Numerical Aperture," *J. Light. Technol.* **37**, 3734–3739 (2019).
 15. B. Patiño-Jurado, J. F. Botero-Cadavid, and J. Garcia-Sucerquia, "Cone-shaped optical fiber tip for cost-effective digital lensless holographic microscopy," *Appl. Opt.* **59**, 2969–2975 (2020).
 16. B. Patiño-Jurado, J. F. Botero-Cadavid, and J. Garcia-Sucerquia, "Digital Lensless Holographic Microscopy with Engineered Optical Fiber Point Source," in *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging 2019* (OSA, 2019), p. Th3A.5.
 17. H. Tobon, C. Trujillo, and J. Garcia-Sucerquia, "Preprocessing in digital lensless holographic microscopy for intensity reconstructions with enhanced contrast," *Appl. Opt.* **60**, A215 (2021).
 18. J. Garcia-Sucerquia, "Noise reduction in digital lensless holographic microscopy by engineering the light from a light-emitting diode," *Appl. Opt.* **52**, A232–A239 (2013).
 19. P. Piedrahita-Quintero, C. Trujillo, and J. Garcia-Sucerquia, "JDiffraction: A GPGPU-accelerated JAVA library for numerical propagation of scalar wave fields," *Comput. Phys. Commun.* **214**, 128–139 (2017).
 20. Open Source Hardware Association, "Open Hardware Definition," <https://www.oshwa.org/definition/>.
 21. R. Antoniou, J. Bonvoisin, P.-Y. Hsing, E. Dekoninck, and D. Defazio, "Defining success in open source hardware development projects: a survey of practitioners," *Des. Sci.* **8**, e8 (2022).
 22. J. M. Pearce, "Sponsored Libre Research Agreements to Create Free and Open Source Software and Hardware," *Inventions* **3**, (2018).
 23. K. Balka, C. Raasch, and C. Herstatt, "The Effect of Selective Openness on Value

- Creation in User Innovation Communities," *J. Prod. Innov. Manag.* **31**, 392–407 (2014).
24. M. L. Santos, L. R. Zacharias, and V. R. Cota, "Open-source hardware to face COVID-19 pandemic: the need to do more and better," *Res. Biomed. Eng.* **38**, 127–138 (2022).
 25. C. Gacek and B. Arief, "The many meanings of open source," *IEEE Softw.* **21**, 34–40 (2004).
 26. A. Powell, "Democratizing production through open source knowledge: from open software to open hardware," *Media, Cult. Soc.* **34**, 691–708 (2012).
 27. N. Chakravorty, C. S. Sharma, K. A. Molla, and J. K. Pattanaik, "Open Science: Challenges, Possible Solutions and the Way Forward," *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* **88**, 456–471 (2022).
 28. J. Bonvoisin and R. Mies, "Measuring Openness in Open Source Hardware with the Open-o-Meter," *Procedia CIRP* **78**, 388–393 (2018).
 29. UNESCO, "Open Hardware Maker Curriculum," <https://curriculum.openhardware.space/articles/06-licenses-and-standards/>.
 30. M. P. da COSTA and F. C. L. LEITE, "Open access in the world and Latin America: A review since the Budapest Open Access Initiative," *Transinformação* **28**, 33–46 (2016).
 31. E. Commission, D.-G. for Research, Innovation, C. Cabello Valdes, B. Rentier, E. Kaunismaa, J. Metcalfe, F. Esposito, D. McAllister, K. Maas, K. Vandeveld, and C. O'Carroll, *Evaluation of Research Careers Fully Acknowledging Open Science Practices: Rewards, Incentives and/or Recognition for Researchers Practicing Open Science* (Publications Office, 2017).
 32. G. Bot, L. Heller, datawomanHUB, mcancellieri, B. Kramer, T. Ross-Hellauer, ilabastida, helenebr, P. Fernandes, and J. Tennant, "Open Science Training Handbook," (2018).
 33. CONGRESO DE COLOMBIA, *Plan Nacional de Desarrollo* (2023).
 34. V. Nilsen and G. Anelli, "Knowledge transfer at CERN," *Technol. Forecast. Soc. Change* **112**, 113–120 (2016).
 35. F. Fluckiger, *Final Report of the Open Source Software Licence Task Force* (2012).
 36. F. Arndt, J. Bonvoisin, T. Burkert, L. Schattenhofer, J. Vos, F. Flüchter, M. Haeuer, D. Jäger, T. Wille, M. Hassan, R. Mies, B. John, M. Moritz, T. Redlich, C. Schmidt-

- Gütter, E. Velis, J. Well, D. Wingerden, T. Wenzel, and L. Zimmermann, "DIN SPEC 3105-1: Open Source Hardware," (2020).
37. prusa3d, "Original-Prusa-MINI," GitHub Repos. (2021).
 38. Adafruit, "Adafruit OSH Certified Projects,"
<https://certification.oshwa.org/list.html?q=adafruit>.
 39. T. Baden, A. M. Chagas, G. Gage, T. Marzullo, L. L. Prieto-Godino, and T. Euler, "Open Labware: 3-D Printing Your Own Lab Equipment," *PLOS Biol.* **13**, e1002086 (2015).
 40. J. M. Pearce, "Economic savings for scientific free and open source technology: A review," *HardwareX* **8**, e00139 (2020).
 41. S. Oberloier, N. Gallup, and J. M. Pearce, "Overcoming supply disruptions during pandemics by utilizing found hardware for open source gentle ventilation," *HardwareX* **11**, e00255 (2022).
 42. G. Niezen, P. Eslambolchilar, and H. Thimbleby, "Open-source hardware for medical devices," *BMJ Innov.* **2**, 78–83 (2016).
 43. R. Malkin and K. von Oldenburg Beer, "Diffusion of Novel Healthcare Technologies to Resource Poor Settings," *Ann. Biomed. Eng.* **41**, 1841–1850 (2013).
 44. Open Source Hardware Association, "OSHW CERTIFICATION REQUIREMENTS," <https://certification.oshwa.org/requirements.html>.
 45. M. Vázquez, L. Anfossi, H. Ben-Yoav, L. Diéguez, T. Karopka, B. Della Ventura, S. Abalde-Cela, A. Minopoli, F. Di Nardo, V. K. Shukla, A. Teixeira, A. Tvarijonaviciute, and L. Franco-Martínez, "Use of some cost-effective technologies for a routine clinical pathology laboratory," *Lab Chip* **21**, 4330–4351 (2021).
 46. World Health Organization, *Malaria Microscopy Quality Assurance Manual-Version 2.*, 2nd ed. (World Health Organization, 2016).
 47. A. Maia Chagas, L. L. Prieto-Godino, A. B. Arrenberg, and T. Baden, "The €100 lab: A 3D-printable open-source platform for fluorescence microscopy, optogenetics, and accurate temperature control during behaviour of zebrafish, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*," *PLOS Biol.* **15**, e2002702 (2017).
 48. J. T. Collins, J. Knapper, J. Stirling, J. Mduda, C. Mkindi, V. Mayagaya, G. A. Mwakajinga, P. T. Nyakyi, V. L. Sanga, D. Carbery, L. White, S. Dale, Z. Jieh Lim, J. J. Baumberg, P. Cicuta, S. McDermott, B. Vodenicharski, and R. Bowman, "Robotic microscopy for everyone: the OpenFlexure microscope," *Biomed. Opt. Express* **11**, 2447 (2020).

49. J. S. Cybulski, J. Clements, and M. Prakash, "Foldscope: origami-based paper microscope," *PLoS One* **9**, e98781 (2014).
50. B. Diederich, R. Lachmann, S. Carlstedt, B. Marsikova, H. Wang, X. Uwurukundo, A. S. Mosig, and R. Heintzmann, "A versatile and customizable low-cost 3D-printed open standard for microscopic imaging," *Nat. Commun.* **11**, 5979 (2020).
51. T. Cacace, V. Bianco, B. Mandracchia, V. Pagliarulo, E. Oleandro, M. Paturzo, and P. Ferraro, "Compact off-axis holographic slide microscope: design guidelines," *Biomed. Opt. Express* **11**, 2511 (2020).
52. M. Ugele, M. Weniger, M. Leidenberger, Y. Huang, M. Bassler, O. Friedrich, B. Kappes, O. Hayden, and L. Richter, "Label-free, high-throughput detection of *P. falciparum* infection in sphered erythrocytes with digital holographic microscopy," *Lab Chip* **18**, 1704–1712 (2018).
53. G. Popescu, *Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues* (McGraw Hill Professional, 2011).
54. V. Balasubramani, M. Kujawińska, C. Allier, V. Anand, C.-J. Cheng, C. Depeursinge, N. Hai, S. Juodkasis, J. Kalkman, A. Kuś, and others, "Roadmap on digital holography-based quantitative phase imaging," *J. Imaging* **7**, 252 (2021).
55. 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).
56. Y. Park, C. Depeursinge, and G. Popescu, "Quantitative phase imaging in biomedicine," *Nat. Photonics* **12**, 578–589 (2018).
57. T. O'Connor, J.-B. Shen, B. T. Liang, and B. Javidi, "Digital holographic deep learning of red blood cells for field-portable, rapid COVID-19 screening," *Opt. Lett.* **46**, 2344 (2021).
58. A. Saetchnikov, V. Saetchnikov, E. Tcherniavskaia, and A. Ostendorf, "Effect of a thin reflective film between substrate and photoresin on two-photon polymerization," *Addit. Manuf.* **24**, 658–666 (2018).
59. L. Xu, X. Peng, J. Miao, and A. K. Asundi, "Studies of digital microscopic holography with applications to microstructure testing," *Appl. Opt.* **40**, 5046 (2001).
60. Y. Emery, T. Colomb, and E. Cuche, "Metrology applications using off-axis digital holography microscopy," *J. Phys. Photonics* **3**, 034016 (2021).
61. 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 (2006).
62. J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, P. Klages, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy," *Appl. Opt.* **45**, 836 (2006).
63. D. Gabor, "A New Microscopic Principle," *Nature* **161**, 777–778 (1948).
64. H. J. Kreuzer, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen, and W. Xu, "Digital in-line holography with numerical reconstruction: 4D tracking of microstructures and organisms," in (2003), Vol. 5005, pp. 299–306.
65. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, 3rd ed. (Roberts & Company Publishers, 2005).
66. J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. K. Jericho, M. H. H. Jericho, P. Klages, and H. J. J. Kreuzer, "Resolution power in digital in-line holography," in *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* (2006), Vol. 6027 I.
67. W. Zhang, H. Zhang, L. Cao, M. Gehm, Q. Jiang, D. J. Brady, and G. Jin, "Resolution and sampling analysis in digital in-line holography with spherical wave illumination," *Opt. Eng.* **59**, 1 (2019).
68. Siemens, "3D printing: an open source revolution for hardware," White Pap. (n.d.).
69. E. J. Davis, M. Jones, D. A. Thiel, and S. Pauls, "Using Open-Source, 3D Printable Optical Hardware To Enhance Student Learning in the Instrumental Analysis Laboratory," *J. Chem. Educ.* **95**, 672–677 (2018).
70. 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).
71. G. de Ó. y P. OptoDigital, "DLHM UNAL," <https://unal-optodigital.github.io/DLHM/>.
72. A. El Gamal and H. Eltoukhy, "CMOS image sensors," *IEEE Circuits Devices Mag.* **21**, 6–20 (2005).
73. S. K. K. Jericho, J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, M. H. H. Jericho, and H. J. J. Kreuzer, "Submersible digital in-line holographic microscope," *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 1–10 (2006).
74. D. Chicco, M. J. Warrens, and G. Jurman, "The coefficient of determination R-squared is more informative than SMAPE, MAE, MAPE, MSE and RMSE in regression analysis evaluation," *PeerJ Comput. Sci.* **7**, e623 (2021).
75. F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, V. Dubourg, J. Vanderplas, A. Passos, D. Cournapeau, M. Brucher, M. Perrot, and E. Duchesnay, "Scikit-learn: Machine

- Learning in {P}ython," *J. Mach. Learn. Res.* **12**, 2825–2830 (2011).
76. E. E. Te Hwu and A. Boisen, "Hacking CD/DVD/Blu-ray for Biosensing," *ACS Sensors* (2018).
 77. M. Sanz, J. Á. Picazo-Bueno, L. Granero, J. García, and V. Micó, "Multi-illumination single-holographic-exposure lensless Fresnel (MISHELF) microscopy using 4 channels," in *Imaging and Applied Optics 2019 (COSI, IS, MATH, PcAOP)*, OSA Technical Digest (Optical Society of America, 2019), p. JW2A.1.
 78. J. A. Picazo-bueno, K. Trindade, M. Sanz, and V. Mic, "Design, Calibration, and Application of a Robust, Cost-Effective, and High-Resolution Lensless Holographic Microscope," (2022).
 79. B. Patiño-Jurado, J. F. Botero-Cadavid, and J. Garcia-Sucerquia, "Analytical study of the numerical aperture of cone-shaped optical fibers: A tool for tailored designs," *Heliyon* (2019).
 80. D. R. Turner, "Etch procedure for optical fibers," U.S. patent US4469554A (1983).
 81. S. Verhaverbeke, I. Teerlinck, C. Vinckier, G. Stevens, R. Cartuyvels, and M. M. Heyns, "The Etching Mechanisms of SiO₂ in Hydrofluoric Acid," *J. Electrochem. Soc.* **141**, 2852–2857 (1994).
 82. A. E. Siegman, *Lasers*, 1st ed. (University Science Books, 1986).
 83. B. E. A. Saleh and M. C. Teich, *Fundamentals of Photonics*, 2nd ed. (Wiley, 2007).
 84. S. I. Zapata-Valencia, "Automatic method to measure the numerical aperture of a propagating Gaussian light beam," *Opt. Pura y Apl.* **55**, 1–8 (2022).
 85. K. Levenberg, "A method for the solution of certain non-linear problems in least squares," *Q. Appl. Math.* **2**, 164–168 (1944).
 86. P. Virtanen, R. Gommers, T. E. Oliphant, M. Haberland, T. Reddy, D. Cournapeau, E. Burovski, P. Peterson, W. Weckesser, J. Bright, S. J. van der Walt, M. Brett, J. Wilson, K. J. Millman, N. Mayorov, A. R. J. Nelson, E. Jones, R. Kern, E. Larson, C. J. Carey, Í. Polat, Y. Feng, E. W. Moore, J. VanderPlas, D. Laxalde, J. Perktold, R. Cimrman, I. Henriksen, E. A. Quintero, C. R. Harris, A. M. Archibald, A. H. Ribeiro, F. Pedregosa, and P. van Mulbregt, "SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python," *Nat. Methods* **17**, 261–272 (2020).
 87. A. Barucci, F. Cosi, A. Giannetti, S. Pelli, D. Griffini, M. Insinna, S. Salvadori, B. Tiribilli, and G. C. Righini, "Optical fibre nanotips fabricated by a dynamic chemical etching for sensing applications," *J. Appl. Phys.* **117**, 53104 (2015).

88. S. Berneschi, A. Barucci, F. Baldini, F. Cosi, F. Quercioli, S. Pelli, G. C. Righini, B. Tiribilli, S. Tombelli, C. Trono, and A. Giannetti, "Optical Fibre Micro/Nano Tips as Fluorescence-Based Sensors and Interrogation Probes," *Optics* **1**, 213–242 (2020).
89. "ISM Polypropilene Compatibility Chart,"
<https://www.industrialspec.com/images/files/polypropylene-chemical-compatibility-chart-from-ism.pdf>.
90. T. C. INC, "Silicon Dioxide (SiO₂) Etchants," <https://transene.com/sio2/>.
91. International Organization for Standardization, "Stainless steel needle tubing for the manufacture of medical devices — Requirements and test methods (ISO 9626)," (2016).
92. Hamilton Company, "Needle Gauge Chart,"
<https://www.hamiltoncompany.com/laboratory-products/needles-knowledge/needle-gauge-chart>.
93. H. S. Gill and M. R. Prausnitz, "Does Needle Size Matter?," *J. Diabetes Sci. Technol.* **1**, 725–729 (2007).
94. Thorlabs, "SM600 - Single Mode Optical Fiber, 633 - 780 nm, Ø125 µm Cladding,"
<https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=SM600>.
95. Concejo Nacional de Estupefacientes de Colombia., *Resolución No. 0001 Del 8 de Enero de 2015* (2015).
96. M. Sanz, J. Á. Picazo-Bueno, L. Granero, J. Garcíá, and V. Micó, "Compact, cost-effective and field-portable microscope prototype based on MISHELF microscopy," *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
97. D. H. Hong, M. Il Kang, and S. W. Kim, "Development of a low-cost microscope using a DVD optical pickup head," *Optik (Stuttg.)* **124**, 2089–2092 (2013).
98. Y.-C. Lee and S. Chao, "A Compact and Low-Cost Optical Pickup Head-Based Optical Microscope," *IEEE Trans. Magn.* **50**, 1–4 (2014).
99. H.-Y. Chung, W.-C. Kuo, Y.-H. Cheng, C.-H. Yu, S.-H. Chia, C.-Y. Lin, J.-S. Chen, H.-J. Tsai, A. B. Fedotov, A. A. Ivanov, A. M. Zheltikov, and C.-K. Sun, "Blu-ray disk lens as the objective of a miniaturized two-photon fluorescence microscope," *Opt. Express* **21**, 31604 (2013).
100. H. Ramachandraiah, M. Amasia, J. Cole, P. Sheard, S. Pickhaver, C. Walker, V. Wirta, P. Lexow, R. Lione, and A. Russom, "Lab-on-DVD: standard DVD drives as a novel laser scanning microscope for image based point of care diagnostics," *Lab Chip* **13**, 1578 (2013).

101. L. I. Segerink, M. J. Koster, A. J. Sprenkels, and A. van den Berg, "A low-cost 2D fluorescence detection system for μm sized beads on-chip," *Lab Chip* **12**, 1780 (2012).
102. R.-Y. Tsai, J.-P. Chen, Y.-C. Lee, H.-C. Chiang, C.-M. Cheng, C.-C. Huang, T.-T. Huang, C.-T. Cheng, and G. Tiao, "Cell depth imaging by point laser scanning fluorescence microscopy with an optical disk pickup head," *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**, 09MD01 (2015).
103. S. Morais, J. Carrascosa, D. Mira, R. Puchades, and Á. Maquieira, "Microimmunoanalysis on Standard Compact Discs To Determine Low Abundant Compounds," *Anal. Chem.* **79**, 7628–7635 (2007).
104. E. E.-T. Hwu and A. Boisen, "Hacking CD/DVD/Blu-ray for Biosensing," *ACS Sensors* **3**, 1222–1232 (2018).
105. F. Grey, "Creativity unleashed," *Nat. Nanotechnol.* **10**, 480–480 (2015).
106. M. Sanz, J. Á. Picazo-Bueno, L. Granero, J. García, and V. Micó, "Compact, cost-effective and field-portable microscope prototype based on MISHELF microscopy," *Sci. Rep.* **7**, 43291 (2017).
107. H. Tobón-Maya, A. Gómez-Ramírez, C. Buitrago-Duque, and J. Garcia-Sucerquia, "Adapting a Blu-ray optical pickup unit as a point source for digital lensless holographic microscopy," *Appl. Opt.* **62**, D39 (2023).
108. H. Tobón-Maya, "ODP-UPU-DLHM," <https://github.com/unal-optodigital/OPU-DLHM>.
109. S. I. Zapata-Valencia, H. Tobon-Maya, and J. Garcia-Sucerquia, "Image enhancement and field of view enlargement in digital lensless holographic microscopy by multi-shot imaging," *J. Opt. Soc. Am. A* **40**, C150 (2023).
110. H. Tobón-Maya, A. Gómez-Ramírez, and J. Garcia-Sucerquia, "Digital Lensless holographic microscopy based on an optical pick-up unit," in *Latin America Optics and Photonics (LAOP) Conference 2022* (Optica Publishing Group, 2022), p. W1D.3.
111. R. Hentschel, B. Braunecker, and H. J. Tiziani, eds., *Advanced Optics Using Aspherical Elements* (SPIE, 2008).
112. O. Svelto, *Principles of Lasers*, 5th ed. (Springer Science+Business Media, 2010).
113. H. Sun, *Laser Diode Beam Basics, Manipulations and Characterizations*, SpringerBriefs in Physics (Springer Netherlands, 2012).

114. Schäfter + Kirchhoff, "ASTIGMATISM CORRECTION,"
<https://www.sukhamburg.com/support/technotes/fiberoptics/coupling/anamorphic/a-stigmatismcorr.html>.
115. Thorlabs, "Thorlabs beam circularization,"
https://www.thorlabs.com/images/TabImages/Elliptical_Beam_Circularization_Lab_Fact.pdf.
116. Teledyne Lumenera, "Teledyne notes on: Minimizing spherical aberration,"
<https://www.lumenera.com/blog/minimizing-spherical-aberration-make-the-right-lens-choice-for-your-imaging-system>.
117. Edmund Optics, "Edmund Optics Knowledge Center-All about aspherical lenses,"
<https://www.edmundoptics.com/knowledge-center/application-notes/optics/all-about-aspheric-lenses>.
118. S. I. Zapata-Valencia, H. Tobon-Maya, and J. García-Sucerquia, "Automatic method to measure the numerical aperture of a propagating Gaussian light beam," *Opt. Pura y Apl.* **55**, 1–8 (2022).
119. G. de Ó. y P. OptoDigital, "DLHM-OSH-Microscope. OSF Repository,"
https://osf.io/23mzu/?view_only=8473cd7bdc07486287722e108a6623fe.
120. CONACYT, *CONACYT DIAGNÓSTICO DE MADUREZ DE LA TECNOLOGÍA* (n.d.).
121. C. A. Buitrago-Duque, S. I. Zapata-Valencia, H. Tobon-Maya, A. Gomez-Ramirez, and J. Garcia-Sucerquia, "Introduction to holography at undergraduate level using research-grade open-source software," in *Seventeenth Conference on Education and Training in Optics and Photonics: ETOP 2023*, M. McKee and D. J. Hagan, eds. (SPIE, 2023), Vol. 12723, p. 127231V.
122. S. I. Zapata-Valencia, A. Gómez-Ramírez, H. Tobon-Maya, C. A. Buitrago-Duque, and J. Garcia-Sucerquia, "Beyond maxima and minima: a hands-on approach for undergraduate teaching of diffraction," in *Seventeenth Conference on Education and Training in Optics and Photonics: ETOP 2023*, M. McKee and D. J. Hagan, eds. (SPIE, 2023), Vol. 12723, p. 1272302.
123. R. Scherrer, T. Quiniou, T. Jauffrais, H. Lemonnier, S. Bonnet, and N. Selmaoui-Folcher, "Holographic reconstruction enhancement via unpaired image-to-image translation," *Appl. Opt.* **61**, 9807 (2022).
124. X. Chen, H. Wang, A. Razi, M. Kozicki, and C. Mann, "DH-GAN: a physics-driven untrained generative adversarial network for holographic imaging," *Opt. Express*

- 31**, 10114 (2023).
125. C. A. Trujillo and J. Garcia-Sucerquia, "Automatic method for focusing biological specimens in digital lensless holographic microscopy," *Opt. Lett.* **39**, 2569–2572 (2014).
 126. C. Pacheco, G. N. McKay, A. Oommen, N. J. Durr, R. Vidal, and B. D. Haeffele, "Adaptive sparse reconstruction for lensless digital holography via PSF estimation and phase retrieval," *Opt. Express* **30**, 33433 (2022).
 127. M. Montoya, M. J. Lopera, A. Gómez-Ramírez, C. Buitrago-Duque, A. Pabón-Vidal, J. Herrera-Ramirez, J. Garcia-Sucerquia, and C. Trujillo, "FocusNET: An autofocusing learning-based model for digital lensless holographic microscopy," *Opt. Lasers Eng.* **165**, 107546 (2023).
 128. Thorlabs, "Thorlabs Aspherical Lens 357610-A," <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=357610-A>.
 129. von F. Zernike, "Beugungstheorie des schneidenver-fahrens und seiner verbesserten form, der phasenkontrastmethode," *Physica* **1**, 689–704 (1934).
 130. "Zemax Optic Studio," <https://www.ansys.com/products/optics-vr/ansys-zemax-opticstudio>.