



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
ELÉCTRICA – INSTRUMENTACIÓN

MICROSCOPIA CONFOCAL MULTILONGITUD DE ONDA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
JAHIR ALEJANDRO SOSA ACOSTA

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. CELIA ANGELINA SÁNCHEZ PÉREZ
INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA - ICAT

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. DICIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DR. QURESHI NASER
Secretario: DR. VELÁZQUEZ BENÍTEZ AMADO MANUEL
1 er. Vocal: DRA. SÁNCHEZ PÉREZ CELIA ANGELINA
2 do. Vocal: DR. CUEVAS CARDONA SALVADOR C.
3 er. Vocal: DR. GASTÉLUM STROZZI ALFONSO

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y
TECNOLOGÍA (ICAT) - GRUPO DE DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS

TUTORA DE TESIS:

DRA. CELIA ANGELINA SÁNCHEZ PÉREZ

FIRMA

El presente trabajo fue desarrollado en el Grupo de Dispositivos Biomédicos del Departamento de Instrumentación científica e Industrial del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Celia A. Sánchez Pérez, dentro del proyecto PAPIIT-IT100518.

*Los libros no están hechos para que uno crea
en ellos, sino para ser sometidos a
investigación. Cuando consideramos un libro,
no debemos preguntarnos qué dice, sino qué
significa.*

Umberto Eco

*¿No sería más hermoso el mundo si las
bibliotecas fueran más importantes que los
bancos?*

Felipe - Mafalda

Agradecimientos

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ingeniería Eléctrica por ser mi segunda casa durante estos 2 años. Me siento muy orgulloso de pertenecer a esta gran institución y por brindarme la oportunidad de crecer en lo académico, en lo profesional y en lo personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado durante el posgrado para dedicarme de tiempo completo al desarrollo de este trabajo.

Al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la UNAM, por recibirme durante todos estos años en sus instalaciones, que me permitieron desarrollar todas mis habilidades y amar el desarrollo científico.

A mi directora de tesis, la Dra. Celia A. Sánchez Pérez, por su gran calidad humana, sus consejos y por permitirme durante todo este tiempo pertenecer a su Grupo de Dispositivos Biomédicos. Gracias a su apoyo, paciencia y amistad no hubiera sido posible nada de este trabajo. Siempre estaré agradecido por todo lo que hizo por mí.

A los sinodales, por su tiempo, su dedicación para revisar este trabajo, su conocimiento y sus conocimientos, por sus valiosas observaciones que me ayudaron a terminar la tesis de la mejor manera.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, por el apoyo brindado a través del proyecto PAPIIT-IT100518, "Sistema confocal en fibra óptica para el estudio morfológico de tejido hepático".

A todos mis profesores del posgrado, que me transmitieron ese amor por el conocimiento y la ciencia. Todo mi reconocimiento para cada uno de ellos.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su ayuda, su tiempo y su amabilidad para el estudio de las muestras usadas en este trabajo a través del Microscopio Confocal de la Unidad de Microscopía

A mi familia y amigos:

A mi madre, Angélica Rocío por tu amor y cariño incondicional. Gracias por siempre apoyarme en mis locuras y ser mi soporte durante este posgrado, este triunfo es también tuyo. Gracias por siempre creer en mí y en lo que soy capaz de hacer, por regañarme, llamarme la atención y darme consejos. Porque eres mi ejemplo a seguir, me inspiras, te admiro, te respeto y amo con todo mi corazón. Muchas gracias mamá.

A mi hermano Juan Carlos que desde el cielo nos cuidas a todos, donde quiera que estés, te dedico este triunfo.

A mi hermano Denilson Geovani, gracias por estar siempre ahí cuando más lo necesito, darme un consejo, darme ánimos, aguantar mi mal humor, por permitirme compartir esta hermosa etapa de la universidad a tu lado, gracias por cada momento, deseo que logres todas tus metas, te conviertas en un gran ser humano y excelente ingeniero. Gracias hermano

Al amor de mi vida Andrea, por ser mi todo, mi compañera, mi amiga, mi confidente en esta hermosa etapa de mi vida. Gracias por nunca dejarme caer ni rendirme cuando veías mi frustración en la tesis, por tus consejos,

por amarme como soy, por permitirme entrar en tu corazón y amarte. Porque siempre crees en mí y apoyas mis locuras, pero sobre todo por mantenerme los pies sobre la tierra. Amo esa hermosa sonrisa y esos enormes ojos. Por el gran futuro que nos espera juntos. Siempre tuyo, siempre mío, siempre nuestro.

A mis abuelitos, Rufina y Fernando, por sus cuidados y preocupaciones, por su infinito amor hacia mí. Siempre han estado conmigo en todo momento, gracias por inculcarme el valor del trabajo y la dedicación. Sin su apoyo no sería el hombre que soy ahora. Gracias abuelitos.

A mi tío Fernando, por tus cuidados, tus preocupaciones, tu inmenso cariño. Gracias por depositar siempre tu confianza en mí y porque a pesar de todo y de todos, sigues aprendiendo. Gracias tío.

A mis amigos de generación de posgrado: Abraham, Héctor, Rodolfo, Ana, Andrés, Ernesto, Carlos, Ricardo por tener la fortuna de haberlos conocido y por vivir experiencias a su lado. De cada uno aprendí mucho. Gracias por su amistad.

A Alma y Fredy, por sus consejos, sus comentarios, su conocimiento, les agradezco infinitamente el haberme hecho más ameno el tiempo durante mi estancia en el laboratorio, sé que me llevo dos grandes amistades. Gracias

Índice

Resumen	10
Motivación y objetivos.....	11
Capítulo 1. Microscopia confocal	12
1.1 Introducción	12
1.2 Comparación del microscopio clásico con otras tecnologías	13
1.3 Fundamentos de la microscopia confocal	14
1.3.1 Resolución axial.....	14
1.3.2 Resolución de escaneo.....	15
1.3.3 Filtrado espacial.....	16
1.3.4 Apertura numérica	17
1.4 Montaje de un Microscopía Confocal Clásico	17
1.5 Algunas técnicas de microscopia confocal.....	18
1.5.1 Microscopio confocal monocromático (MCM).....	20
1.5.1.1 Microscopio confocal de fibra óptica con escáner MEMS y lente objetiva en miniatura	21
1.5.2 Microscopio Confocal Policromático	23
1.5.2.1 Microscopia confocal con fuente supercontinua multiplexada por división de longitud de onda	24
1.5.2.2 Microscopia confocal cromática para la obtención de imágenes a profundidad del tejido epitelial.	25
1.5.3 Microscopio confocal cromático (MCC)	27
1.5.3.1 Detección de imágenes tridimensionales mediante microscopía confocal cromática.	28
1.6 Microscopio confocal en fibra óptica	30
1.6.1 Funciones clave de la fibra óptica en los microscopios.....	30
1.6.1.1 Microscopio confocal de fibra óptica: FOCON	31
1.6.1.2 Expandiendo el ámbito de la detección confocal de fibra óptica para el sensado de la posición, el desplazamiento y la velocidad.....	33
1.7 Propuesta de Microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica	35
Referencias	37
Capítulo 2. Diseño de un microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica (MCMLFO).....	39

2.1 Descripción de funciones dentro del sistema MCMLFO.....	39
2.2 Análisis en transmisión.....	40
2.3 Análisis en reflexión.....	49
Referencias.....	54
Capítulo 3. Caracterización del microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica-MCMLFO.....	56
3.1 Montaje experimental.....	56
3.1.1 Resolución axial.....	58
3.1.2 Resolución espacial.....	60
3.1.3 Filtrado espacial.....	62
3.2 Caracterización utilizando fuentes láser coherentes.....	62
3.3 Repetibilidad y reproducibilidad.....	64
3.3.1 Repetibilidad.....	64
3.3.2 Reproducibilidad.....	65
3.4 Reconstrucción topográfica 3D.....	67
Referencias.....	70
Capítulo 4. Resultados experimentales.....	71
4.1 Reconstrucción de topografía 3D.....	71
4.1.1 Microscopía de un elemento reflejante.....	71
4.1.1.1 Repetibilidad.....	74
4.1.1.2 Reproducibilidad.....	75
4.1.2 Comparación con el microscopio confocal comercial.....	75
4.1.2.1 Microscopía de muestras biológicas.....	78
Referencias.....	90
CONCLUSIONES.....	91
PERSPECTIVAS.....	92
Anexo A. Hoja de Datos - Acoplador 2x1 @ 1550 nm.....	93
Anexo B. Constantes de dispersión de los materiales ópticos.....	94
Anexo C. Hoja de datos de la fibra SMF-28.....	95
Anexo D. Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM.....	96
Referencias.....	97

Resumen

En este trabajo de tesis se describe el diseño y desarrollo de un microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica (MCMLFO), utilizando el fenómeno de aberración cromática que permite interrogar diferentes planos, dando como resultado imágenes que proporcionan información bidimensional y tridimensional de muestras de diferentes tipos. El dispositivo planteado se propone como una herramienta que ayude al análisis morfológico de diferentes tipos de muestras. Asimismo tener un diseño que combine la óptica tradicional y la tecnología de fibra óptica, que sea capaz de adquirir características (dimensiones, topografía, entre otras) sobre las muestras que serán estudiadas en este trabajo. El principio aquí empleado busca resolver problemas del microscopio confocal (MC) tradicional, el escaneo y el filtrado espacial. El primero se realiza punto a punto y conlleva un alto tiempo de análisis, por ende se propone el principio de aberración cromática para interrogar los diferentes planos de la muestra de manera paralela, evitando el desplazamiento mecánico en este eje. En cuanto al filtrado espacial se hace uso de un pinhole (apertura circular), elemento que debido a sus características de fabricación genera fenómenos no deseados para el dispositivo como la difracción, para ello proponemos el uso de la fibra óptica de transmisión como elemento de filtrado. Este desarrollo fue realizado en el Laboratorio de Dispositivos Biomédicos del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) de la UNAM.

La aberración cromática es un fenómeno que en la mayoría de los diseños confocales es evitado completamente. Sin embargo, el enfocar cada longitud de onda en diferentes puntos de la muestra, representa una ventaja en el escaneo y adquisición de la información, permitiendo eliminar el movimiento en el eje focal, simplificando el diseño de este tipo de dispositivos.

Primero se diseñó el MCMLFO, tomando como base la revisión del estado del arte, posteriormente se realizaron cálculos y simulaciones del sistema óptico propuesto. Finalmente se implementó el microscopio confocal descrito en este trabajo y para comprobar el funcionamiento del dispositivo, se realizaron pruebas de repetibilidad y reproducibilidad en la formación de planos confocales. Estas pruebas se realizaron en tres tipos de muestra, cada una con diferentes características. Lo anterior ayudó a comprobar sí los planos caracterizados en el dispositivo, siempre se encontraban en la misma distancia axial, definiendo su resolución en profundidad dentro del sistema. Para el caso de las muestras, conociendo las dimensiones y la composición de la muestra, se comprobó el desempeño del dispositivo y comparación con un microscopio comercial de la marca Nikon.

El desarrollo de este trabajo cumplió con el objetivo de diseñar e implementar un MCMLFO que permite la adquisición de información de planos focales, con una resolución axial de 9 μm , resolución espacial de 1 μm . Además de incorporar la fibra óptica como filtro espacial, eliminación del movimiento mecánico en el eje confocal y la caracterización morfológica de muestras reflejantes y biológicas, principalmente sus dimensiones, fronteras y contorno. En el trabajo a futuro se espera continuar con la mejora del

dispositivo agregando elementos que potencialicen su funcionamiento, que permita convertirla en una herramienta de análisis que beneficie los estudios realizados en el Laboratorio de Dispositivos Biomédicos del ICAT.

Motivación y objetivos.

En la actualidad el uso de un microscopio óptico convencional para el análisis morfométrico de muestras en escalas micrométricas es muy limitado, debido a que no posee los elementos suficientes para poder adquirir información sobre la composición y características relevantes de las muestras. Esta situación ha provocado que se desarrollen tecnologías de mayor resolución que sean capaces de obtener datos en 2D y 3D de la morfología, la estructura, dimensiones, adquisición de imágenes, entre otros, de elementos complejos. Entre las técnicas de alta resolución las más utilizadas en los laboratorios de investigación como de la industria se encuentra la resonancia magnética (MR), la tomografía computarizada (CT), tomografía de coherencia óptica (OCT) y la microscopia confocal (MC), siendo las dos últimas las que presentan similitudes en su implementación, haciendo que sean dos tecnologías comparables. La MC con respecto al OCT tiene mayores ventajas, debido a que posee mayor resolución y mayor penetración, sin embargo este tipo de dispositivos su costo también va en aumento, lo que los hace poco accesibles en el mercado.

Este proyecto propone una herramienta con instrumentación sencilla en espacio libre y haciendo uso de fibra óptica, que permita la adquisición de información para conocer las dimensiones y la topografía de las muestras. A través del principio multilongitud de onda en el rango visible, aprovechando la aberración cromática de las lentes que forman parte del diseño de un microscopio confocal. Como objetivos particulares podemos mencionar:

- Resolución micrométrica en el plano focal (x, y) y en la exploración axial (z).
- Eliminación del movimiento mecánico axial
- Eliminación de la apertura circular como filtro espacial
- Adquisición de dimensiones para la formación de perfil de la muestra.

Capítulo 1. Microcopia confocal

1.1 Introducción

La técnica de microscopia confocal (MC) fue descrita por primera vez por Minsky en 1957 [1] y a la fecha se han desarrollado diferentes versiones que se emplean para llevar a cabo mediciones precisas de desplazamiento y perfiles de superficie a escala milimétrica. El objetivo en un sistema confocal, utilizado como microscopio, es aprovechar la misma óptica para enfocar la luz que se emite de una abertura hacia un objeto y para detectar la luz dispersada desde el objeto hacia la abertura [1]. Es decir, en la microscopia confocal se reconocen estructuras en las que la luz transmitida o reflejada por una muestra es centrada en un solo plano focal y se descarta toda la luz que no procede de ese plano, permitiendo formar con los diferentes puntos de la muestra, una topografía en 3D. Su principio básico radica en la capacidad de eliminar luz reflejada de los planos fuera de foco, logrando así, mejorar la relación señal/ruido de la imagen. Una de las ventajas que presenta el uso de fibra óptica en la MC es la facilidad de alineación, la flexibilidad geométrica y lograr una resolución del orden de los micrómetros. La propiedad de la discriminación de profundidad puede entenderse considerando que la luz desenfocada que alcanza a pasar por la abertura se detecta con mucha menos intensidad que la información enfocada. Por lo tanto, un uso de esta tecnología es proporcionar un método de perfilado de superficie.

Este método atrajo especial interés en aplicaciones tales como la obtención de imágenes de muestras biológicas y materiales semiconductores, en los que se requería una alta definición en dimensiones transversales en el plano de la superficie y longitudinales en la profundidad [2-7]. Por ello, esta técnica se ha convertido en una herramienta comercial ampliamente utilizada que está en un proceso de evolución constante. Los microscopios confocales convencionales realizan escaneos punto por punto tanto en dirección lateral como axial con el fin de formar la imagen de las estructuras tridimensionales haciendo uso de una fuente monocromática. Este tipo de sistema en la literatura se le conoce como visualización de "punto único". La limitación de esta configuración es la velocidad de escaneo relativamente lenta y por el coeficiente termo óptico (cambio en el índice de refracción) de algunos elementos que se usan en este tipo de montaje [9].

En la literatura para resolver este problema de "punto único", se han propuesto sistemas de configuración confocal cromática, con fuentes de ancho espectral amplio (centenas de nm). En donde cada longitud de onda transporta información de un punto particular, se detecta el espectro de la luz reflejada que es filtrada espacialmente, donde finalmente es detectada por un espectrómetro y con esta información se busca reconstruir una imagen. Asimismo se reduce un problema de escaneo tridimensional (3D) en sistemas convencionales a un problema en 2D, es decir, el escaneo (x , y , z) ahora se puede reducir al escaneo (x , y) o (x , z). Las ventajas de utilizar este tipo de montajes es que la información obtenida es de un solo perfil, la medición es puramente óptica, y se ha aumentado la velocidad de escaneo.

1.2 Comparación del microscopio clásico con otras tecnologías

Un dispositivo como el microscopio óptico es un instrumento que permite ver objetos de dimensiones pequeñas o detalles en la estructura de la muestras donde nuestra visión no las puede distinguir a simple vista. Debido a que la resolución que posee nuestro ojo está por debajo de los requerimientos necesarios para observarlos.

Conforme la microscopía óptica fue avanzando a través del tiempo, su perfeccionamiento se dio de manera paulatina, donde grandes inventores fueron aportando sus descubrimientos y correcciones a los microscopios convencionales. Por ejemplo, el uso de diferentes tipos de lentes, las dimensiones de las mismas, la eliminación de efectos cromáticos aumentando la claridad de la imagen. Posteriormente se comenzaron a realizar cálculos matemáticos y óptica geométrica para el diseño de estos instrumentos, creando dispositivos de gran calidad que hoy en día podemos encontrar en varios laboratorios.

Sin embargo, a partir del siglo XX los desarrollos en la microscopía óptica comenzaron a tener nuevas aplicaciones lo que obligó que el diseño de los mismos fueran más sofisticados como consecuencia de buscar obtener información a niveles atómicos de diferentes estructuras. En la figura 1.1 se muestra la comparación de la microscopía confocal con otras tecnologías, como el ultrasonido, el OCT, entre otros, donde resalta que la microscopía confocal posee mayor penetración y resolución en diferentes tipos de muestras. Sin embargo uno de los dispositivos con el que más se le compara es el OCT.

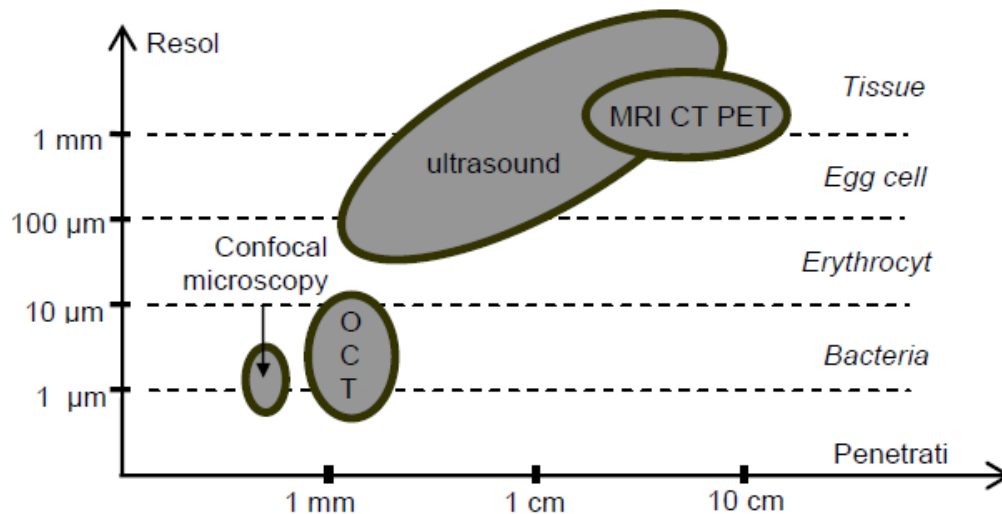


Figura 1.1 Comparación de la microscopía confocal con otras tecnologías [8].

Un instrumento que utiliza haz de electrones en lugar de fotones y que alcanzan una resolución 1000 veces mayor que la de un microscopio convencional es el microscopio electrónico (ME). Tienen la capacidad de proporcionar información morfológica, topográfica, química, cristalina y magnética de materiales que ayudan a la física de estado

sólido en sus investigaciones, también en el desarrollo de nuevos materiales, en la biología, medicina, entre otros, obteniendo información a escalas atómicas.

Sin embargo este tipo de dispositivos son de difícil acceso y solo laboratorios especializados hacen uso de ellos. Es aquí donde la microscopia confocal y OCT toman relevancia debido a que son instrumentos que para efectos de investigación cumple con los requerimientos necesarios para obtener imágenes de alta resolución que en comparación con la microscopia convencional no se tendrían.

Por lo tanto la microscopia confocal tiene las siguientes ventajas sobre la microscopia óptica convencional:

- Imágenes de alta calidad, que presentan mayor nitidez y contraste.
- Mayor resolución lateral y axial
- Estudio de perfiles e imágenes en 3D.
- Relación señal/ruido mejorada
- Permite escaneo de muestras gruesas
- Estudios topográficos
- Amplia gama de campos de aplicación

1.3 Fundamentos de la microscopia confocal

El impacto que ha tenido el desarrollo de microscopia confocal en varios campos de investigación en la actualidad ha sido de gran relevancia, debido a que se pueden obtener imágenes de secciones delgadas, observar muestras en planos inclinados, penetrar en profundidad en muestras que dispersan la luz, obtener perfiles y vistas tridimensionales a muy alta resolución, entre otras.

Este instrumento cuando fue desarrollado en 1957 no generó el impacto deseado, fue hasta 1987 cuando con la ayuda de la teoría óptica, electrónica y tecnología llevó a este dispositivo a tener una relevancia importante en la adquisición de imágenes, consecuencia de que en su diseño hay presencia de fotones y óptica. En este apartado se discutirá algunos principios básicos relacionados con la resolución axial, algunos antecedentes que sientan las bases para el desarrollo de microscopia confocal de barrido láser y al final se realizará una propuesta de microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica, que permita obtener información sobre las dimensiones de algunas muestras.

1.3.1 Resolución axial

El concepto resolución es la cantidad mínima que un instrumento puede distinguir dentro de una medición. Por lo tanto dentro de la microscopia convencional, la resolución es la distancia mínima entre dos puntos (focos) de una muestra [9].

Por lo tanto la resolución axial (eje z) es la medida del cambio de plano focal a lo largo del eje óptico del microscopio, es decir, perpendicular al plano de enfoque en el que se

encuentra la muestra. Para definir la resolución axial, debemos entender que es la distancia mínima a la que los focos generados por la aberración cromática pueden acercarse entre sí a lo largo del eje óptico del microscopio.

Para medir esta resolución en microscopios confocales cromáticos, convencionalmente se hace uso de fuentes de ancho espectral amplio y un espejo colocado en el eje óptico donde se encontrará la muestra. Este recorrerá en un movimiento lineal los diferentes focos provocados por la dispersión presente en las lentes dentro del diseño de este instrumento, como se muestra en la figura 1.2 y el cual se encuentra definido por la ecuación 1.1, donde se relacionan parámetros como lo son: longitud de onda (λ), la apertura numérica (AN) y el índice de refracción del medio del objeto (n), los cuales jugarán un papel importante en las características del objetivo.

$$z = \frac{2\lambda n}{(AN)^2} \quad (1.1)$$

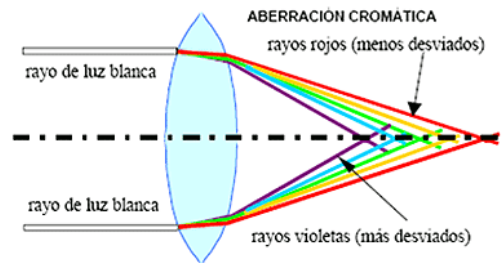


Figura 1.2. Principio de aberración cromática que permitirá interrogar muestras en el eje axial [9].

La resolución axial nos va a permitir encontrar información de diferentes planos de enfoque haciendo uso de solamente un escaneo en 2D y utilizando múltiples longitudes de onda, permitiendo obtener escaneo más rápidos y completos de diferentes muestras.

1.3.2 Resolución de escaneo

Este concepto hace referencia a la capacidad que posee el microscopio confocal de obtener información de dos puntos en el área de escaneo (plano $x-y$) de una muestra sin que se exista traslape. Es decir, es la distancia mínima entre dos puntos, los cuales siempre se observan independientes, evitando que haya cruce de información y provoque una mala interpretación en los resultados. Esta distancia se calcula a partir del tamaño de una imagen de difracción de un punto pequeño del elemento bajo estudio.

Por lo tanto, se tienen dos tipos de resolución óptica, una para las imágenes que se encuentran en el plano focal (x, y) y la otra para imágenes que se encuentran en diferentes planos de la muestra (movimiento axial). El primer caso lo defino como la resolución de escaneo (r_e), que es la nitidez de enfoque, la cual determinará el número y tamaño de pixel y que permitirá distinguir entre dos objetos próximos entre sí, evitando el traslape de información [10] y se encuentra definido por la ecuación 1.2.

$$r_e = \frac{\lambda}{2 AN} \quad (1.2)$$

Es de vital importancia una correcta caracterización de este parámetro, ya que beneficiará la construcción de imágenes bidimensionales y en 3D de los elementos bajo estudio, un mal resultado provocaría información mal analizada y se vería reflejada en las dimensiones adquiridas por el sistema.

1.3.3 Filtrado espacial

Uno de los elementos que conforman un microscopio confocal clásico, es el filtro espacial o llamado pinhole (apertura circular). En la actualidad algunas investigaciones sostienen que este es el talón de Aquiles de este instrumento, debido a que excluye los fotones que aunque no se originaron en el plano de enfoque, aún aportan información relevante con respecto a otros planos debido a su naturaleza no puntual [11]. Asimismo su manufactura juega un papel especial, es decir, al manejar dimensiones tan pequeñas como las micrométricas en su circunferencia, su elaboración no es del todo perfecta y al incidir luz en ella genera efectos no deseados como la difracción, provocando que la señal obtenida se vea afectada, perjudicando el resultado final.

Por lo tanto el uso de filtro espacial debe ser tomado con sus respectivas precauciones debido a que si esta desalineado, si su tamaño se reduce más allá de lo correspondiente, entonces se tendrán consecuencias al reducir severamente el número de fotones que reciba el detector, pero si lo hacemos más grande de lo requerido provocaríamos que esté recolectando información de planos fuera de foco, reduciendo la resolución axial. En conclusión el filtro espacial (d_o) cumple con una función sensible que depende de la longitud de onda y el objetivo, definido por la ecuación 1.3. Pero hay que ser conscientes que aunque se obtenga un filtro óptimo se seguirá excluyendo algunos fotones ya sea por el tamaño o por la manufactura del mismo y es un costo fundamental que se tiene que pagar al hacer uso de este elemento [11].

$$d_o = \frac{1.22 \cdot \lambda}{AN} \quad (1.3)$$

Por tal motivo una de las propuestas de este trabajo es la eliminación del filtro espacial haciendo uso de las características de la fibra óptica, buscando eliminar los planos fuera de foco sin generar efectos de difracción y obtener la información correspondiente al plano de la muestra analizada.

1.3.4 Apertura numérica

La apertura numérica (AN) es una medición de la capacidad de coleccionar luz del sistema. El término se originó en microscopia, donde la expresión equivalente ilustra la capacidad correspondiente al objetivo. El ángulo de aceptación (2θ) que se muestra en la ecuación 1.4 corresponde al ángulo del vértice de mayor cono de rayos que pueden entrar en el núcleo de la fibra y que se describe en la figura 1.3, que se encuentra definida por los índices de refracción del núcleo y revestimiento (n_1, n_2 , respectivamente).

$$AN = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} = n \sin \theta \quad (1.4)$$

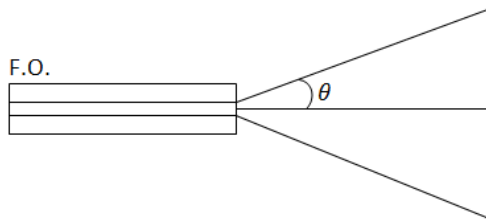


Figura 1.3 Esquemático de la apertura numérica de la fibra óptica.

A continuación se describen los elementos más importantes de un microscopio confocal, sus distintos montajes y sus avances encontrados en la literatura, en los cuales destaca el uso de óptica clásica, fibra óptica, fuentes coherentes y no coherentes.

1.4 Montaje de un Microscopía Confocal Clásico

El principio de la microscopia confocal (MC) es la detección de la señal reflejada que utiliza luz enfocada para interrogar diferentes planos de la muestra a través del movimiento del sistema óptico formando el foco a diferentes distancias de la profundidad de la muestra.

Un MC clásico se encuentra conformado por una fuente de luz coherente, que al poseer una sola longitud de onda permite solo interrogar un punto de la muestra a la vez, un divisor de haz, un juego de lentes y un objetivo, que transmiten la luz proveniente de la fuente hacia la muestra y que en reflexión viaja por estos mismos elementos hacia un pinhole o apertura circular, el cual funcionará como filtro espacial y finalmente llegar a un detector que recibe la intensidad de luz reflejada por la muestra, en la figura 1.4 se observa un diagrama de un MC.

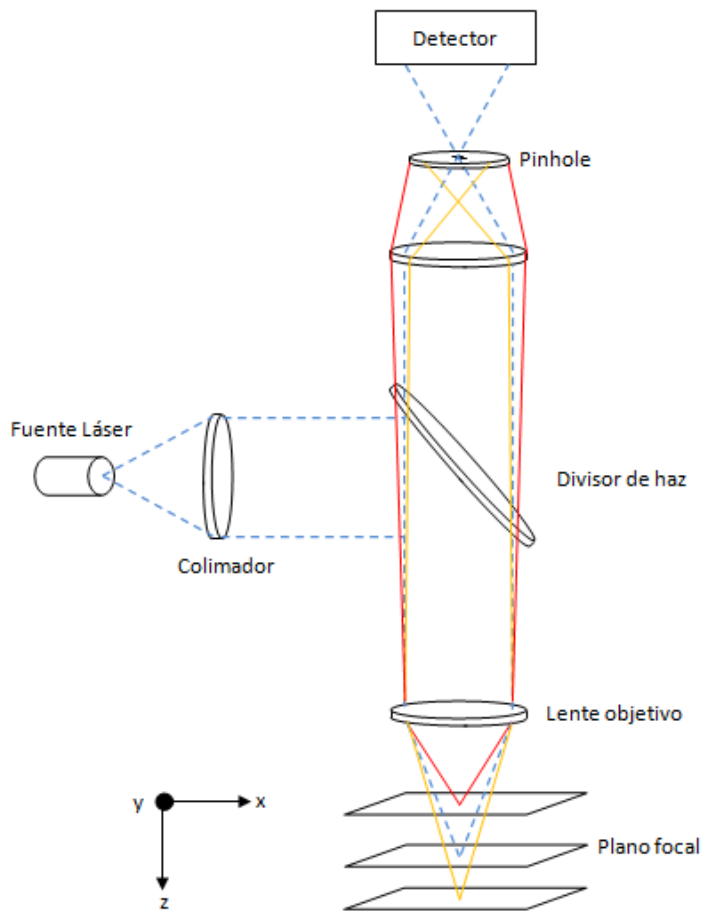


Figura 1.4 Diagrama de un microscopio confocal clásico.

1.5 Algunas técnicas de microscopía confocal.

Como se mencionó en la introducción, la invención del MC se le atribuye al estadounidense Marvin Minsky, el cual desarrolló un prototipo en 1955 donde su principal objetivo era obtener imágenes de tejidos biológicos y observar los eventos que ocurren alrededor de este (in vivo). Lo que destaca de su trabajo era que el enfoque confocal se basaba en el uso del filtrado espacial para eliminar la luz fuera de foco, en aquellas muestras que son más gruesas que el plano de enfoque.[13-19]

Sin embargo, para las muestras biológicas, el movimiento de estas puede causar distorsión, lo que provoca una pérdida de información de la imagen. Con todo lo anterior y sumando que la tecnología de la época no le permitió demostrar el potencial del microscopio confocal, el sistema de Minsky no tuvo relevancia en la adquisición de imágenes biológicas sino años posteriores a su invención.

En la actualidad, el principio básico que se utilizó para el diseño de este tipo de microscopios se ha mantenido intacto debido a los excelentes resultados obtenidos. Los MC de luz toman una gran importancia debido a que permiten ver y fotografiar fácilmente

secciones de tejido histológico de alta resolución, gracias a que se dispone de grandes avances tecnológicos (fuentes de luz, excelente óptica, cámaras digitales, sistemas con gran procesamiento, entre otros) que permite obtener resultados sobresalientes, en la figura 1.5 (a) se puede observar una imagen de un microscopio Nikon, el cual se encuentra conformado por 4 tipos de fuentes monocromáticas, que permite su combinación o su uso individual, además de diferentes tipos de elementos que lo convierten en un instrumento robusto. En la figura 1.5 (b) se observa una imagen adquirida con este tipo de MC y donde se pueden observar diferentes tonos de color que indican en que plano fueron encontrados [12].

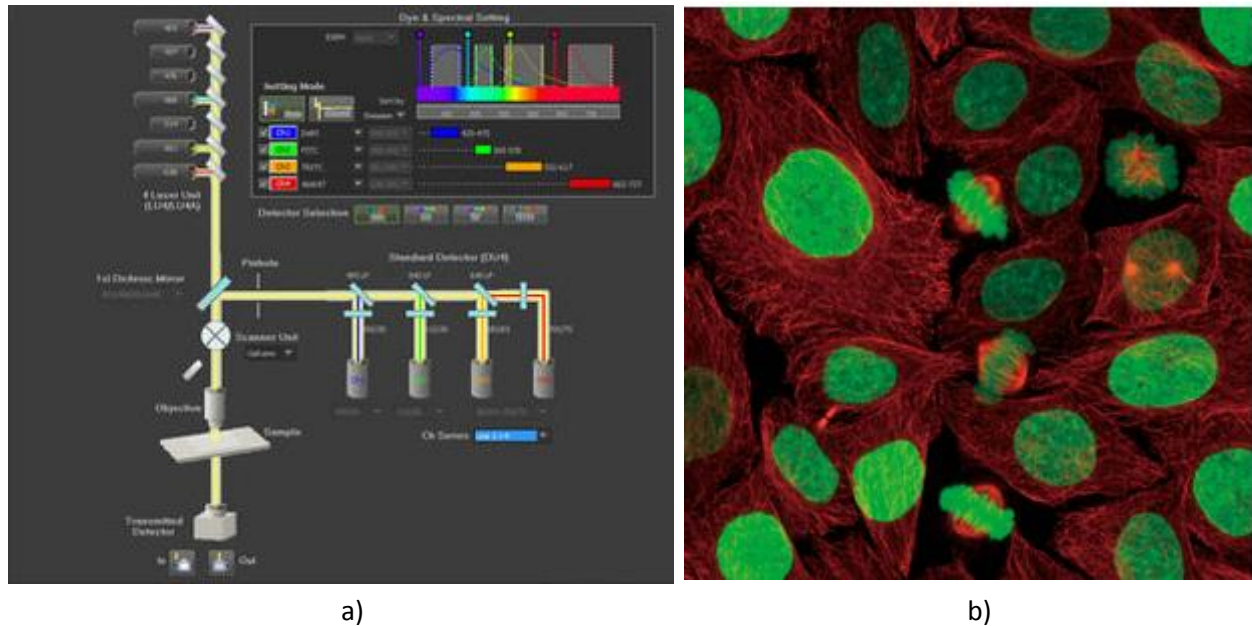


Figura 1.5. a) Diagrama esquemático que MC comercial Nikon, b) imagen adquirida con el dispositivo [12].

Desde 1955 hasta nuestros días, toda la tecnología con la que cuenta un microscopio confocal, se desarrolló de manera independiente y se ha ido incorporando gradualmente a los sistemas de imágenes confocales. A finales del siglo XX se utilizaron por primera vez técnicas de procesamiento de imágenes digitales que se pudieron aplicar de buena manera a este tipo de sistemas.

Existen diferentes tipos de MC, su clasificación se realiza con base al método por el cual escanean las muestras; es decir, encontramos el escaneo por etapas o escaneo estacionario, el primero fue utilizado por Minsky pero resulto bastante lento para la construcción de imagen. Con los avances que se dieron mejoró este problema y en la actualidad son utilizados en la industria de los microchip. El segundo tipo de microscopio confocal es la base de muchos de los sistemas actuales, que ha generado dos vertientes de investigación: los de haz único y haz múltiple, donde el primer caso es el más popular. En este hacen uso de espejos galvanométricos para realizar el escaneo de la muestra a una velocidad de algunos cuadros por segundo, logrando un escaneo más rápido. Existen sistemas que utilizan dispositivos acústico-ópticos o espejos oscilantes. Para el segundo

caso se utilizan dos haces para escanear en tiempo real haciendo uso de un disco Nipkow giratorio y que son utilizados principalmente para detectar fluorescencia.

Asimismo, se ha dejado de utilizar algunos elementos del microscopio confocal original, por ejemplo, ya no se usan las lámparas de tungsteno o mercurio como fuentes de luz, ahora se utiliza un láser monocromático debido a su alta coherencia. También se utilizan algoritmos de computadora que se encargan de calcular y eliminar la información fuera de foco de las imágenes, lo que ha permitido convertirse en una opción práctica para obtener imágenes con mejor contraste. Existen casos donde no se requiere el uso del filtro espacial debido a que el láser excita el fluorocromo en un solo punto de enfoque, eliminando la información que se encuentra fuera de foco.

Sin embargo durante los años 90's, los biólogos se enfrentaron a problemas en el análisis de muestras, debido a la diversidad de estructuras biológicas presentes en sus estudios, lo que provocó la creación de un instrumento especializado donde se pudiera variar el diámetro del filtro espacial. Lo que permitió tener un sistema flexible para obtener imágenes de estructuras biológicas complejas.

Con todos los avances tecnológicos en la microscopia confocal, estos instrumentos se han convertido en sistemas sofisticados y de gran uso, teniendo una gran popularidad en laboratorios por encima de microscopios convencionales. Destacando los microscopios confocales monocromáticos (MCM), microscopios confocales policromáticos (MCP) y microscopios confocales cromáticos (MCC)

Por lo tanto, desde la aparición de la primera generación de microscopios confocales hasta nuestros días, las imágenes obtenidas con este tipo de instrumentos han sido tan sobresalientes que los especialistas en muestras biológicas se adaptaron a esta técnica. Donde se destaca que tiene la ventaja obtener imágenes de muy alta calidad utilizando instrumentación relativamente sencilla y con óptica convencional, logrando que tenga muchas áreas de aplicación en la investigación actual.

1.5.1 Microscopio confocal monocromático (MCM)

En un microscopio confocal monocromático se emplea una fuente de luz que emite en una sola longitud de onda y que trabaja en un mecanismo de retroalimentación para asegurar que el sensor esté posicionado para recibir la señal máxima del objeto ya que se desea recibir información de un plano en específico, como se muestra en la figura 1.6. En la imagen se puede observar todos los elementos que componen a un MC tradicional, desde el láser, colimador, un divisor de haz, lente objetivo, pinhole y detector. Los principales diseños empleados en este tipo de sistemas utilizan montajes en espacio libre, lo que los hace instrumentos bastante robustos, además de que la adquisición de información es puntual, lo que tiene como consecuencia un alto consumo de tiempo de escaneo comparada con otros sistemas.

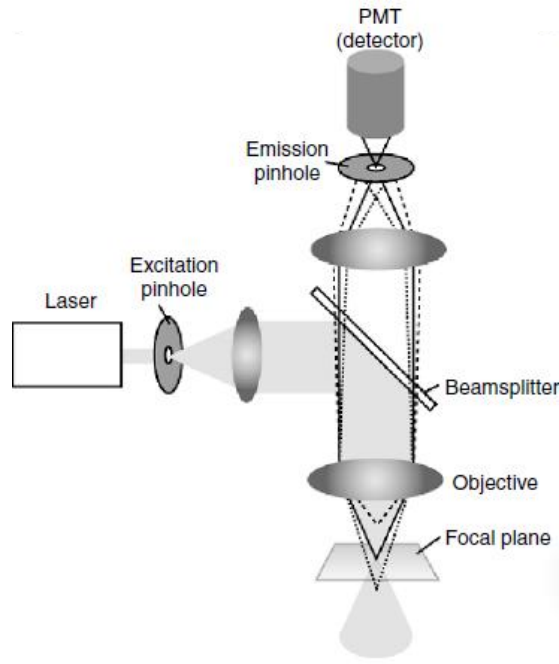


Figura 1.6. Microscopio confocal monocromático [9].

Este tipo de instrumento es utilizado principalmente para mediciones de desplazamiento minucioso y el perfilado de superficie. A continuación se muestra el trabajo de una publicación científica donde se realiza una propuesta con este principio.

1.5.1.1 Microscopio confocal de fibra óptica con escáner MEMS y lente objetiva en miniatura

Este trabajo se publicó en el año de 2007, por el departamento de Bioingeniería de la Universidad de Houston y el departamento de Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Stanford en Estados Unidos [13]. Los autores proponen el diseño y la construcción de un microscopio confocal de fibra óptica monocromático con un sistema escáner basado en elementos micro-electromecánicos (MEMS) y una lente de objetivo en miniatura. Obtuvieron valores de resolución axial y lateral de $9.55 \mu\text{m}$ y $0.83 \mu\text{m}$, respectivamente, asimismo adquirieron imágenes en reflectancia, realizadas en pruebas con tejido bucal humano tanto ex vivo como in vivo. Su principal aportación se da en la rápida adquisición de información puntual.

La importancia de la microscopia confocal en el área in vivo es de alta relevancia, donde esta técnica ha permitido la creación de imágenes confocales con una resolución a nivel celular a profundidades de varios cientos de micrómetros dentro del tejido vivo, donde sus principales aplicaciones destacan en la oftalmología y la dermatología. Todo lo anterior se traduce en el desarrollo de componentes de fibra óptica y elementos ópticos compactos que ayuden a obtener información en espacios confinados dentro del cuerpo humano.

Esta motivación llevo a los autores al desarrollo de espejos de escaneo basado en la tecnología de sistemas micro-electromecánicos (MEMS) que les permitió que las sondas de fibra óptica se convirtieran en un mecanismo de escaneo distal factible. Asimismo para

poder aprovechar al máximo las características de tamaño y rendimiento, la lente objetivo que se usa para enfocar el haz de escaneo también es miniaturizada, como se muestra en el esquema de la figura 1.7. Hacen uso de una fuente diodo láser acoplada a fibra con una longitud de onda de 635 nm, posteriormente es colimada, pasa por un divisor de haz, esta luz se acopla en una segunda fibra monomodal para entregarla a la etapa de escaneo de la muestra, sale de dicha fibra y se colima a un diámetro de 5mm. Posteriormente pasa por el espejo de escaneo que enfoca el haz en el plano confocal que se desea interrogar para después ser dirigido por la lente objetivo, la luz regresa por la misma óptica objetivo-escáner-colimador entra al divisor de haz. Finalmente ingresa a un fotodiodo para adquirir información para la reconstrucción de imágenes. En la figura 1.8 muestran las principales resultados obtenidos al analizar muestras ex vivo, su principio se basa en la intensidad de luz reflejada adquirida.

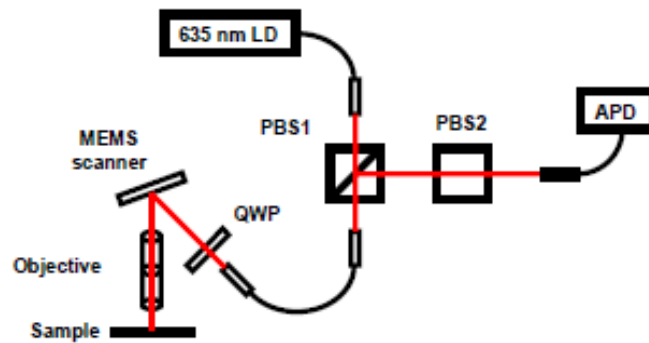


Figura 1.7. Montaje experimental de un microscopio confocal monocromático con escáner MEMS [13].

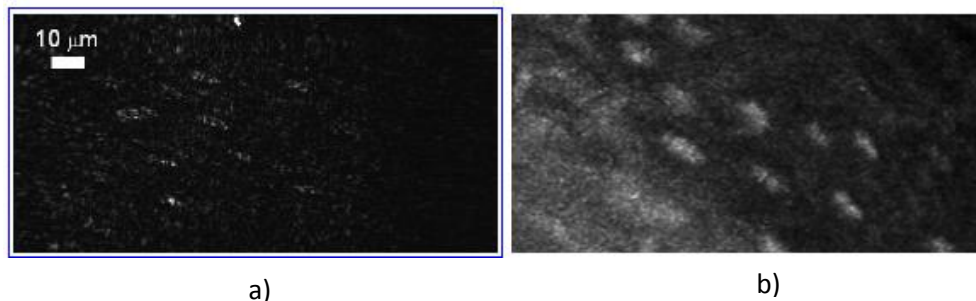


Figura 1.8. Imágenes de reflectancia confocal de tejido oral humano ex vivo: a) MC monocromático con escáner MEMS , b) imagen adquirida con el microscopio confocal Vivascope 2500 de Lucid con el cual fue comparado el trabajo [13].

Este trabajo permitió demostrar que la microscopía confocal basada en MEMS, su rendimiento óptico y mecánico de exploración miniaturizado obtuvo resultados tan satisfactorios que el darle un uso en la endoscopia in vivo se convirtió en algo factible. Asimismo cuando se usan en combinación con componentes de fibra óptica y lentes objetivas miniaturizadas, este tipo de MC puede proporcionar imágenes a resolución

celular en sujetos vivos y donde a futuro podrían evaluar casos clínicos en el diagnóstico de cáncer oral.

1.5.2 Microscopio Confocal Policromático

En este tipo de microscopio se usa múltiples longitudes de onda, donde, a diferencia de la primera propuesta, en este caso se hace uso de una fuente de ancho espectral amplio. La dispersión cromática de la óptica utilizada conducirá a la formación de imágenes a través de las diferentes longitudes de onda que se enfocan en el eje óptico, como se muestra en la figura 1.9. En la imagen se observa los principales elementos que componen a esta técnica: una fuente de ancho espectral amplio que permite tener N longitudes de onda que beneficien la interrogación de los planos que posee una muestra, un divisor de haz que envía la luz hacia una lente que genera el principio de aberración cromática, analizando de forma paralela los planos a través de las longitudes de onda, para finalmente regresar por el mismo camino óptico lente-divisor de haz, entrar en un espectrofotómetro, elemento que permitirá realizar un análisis espectral de la intensidad de luz reflejada por la muestra.

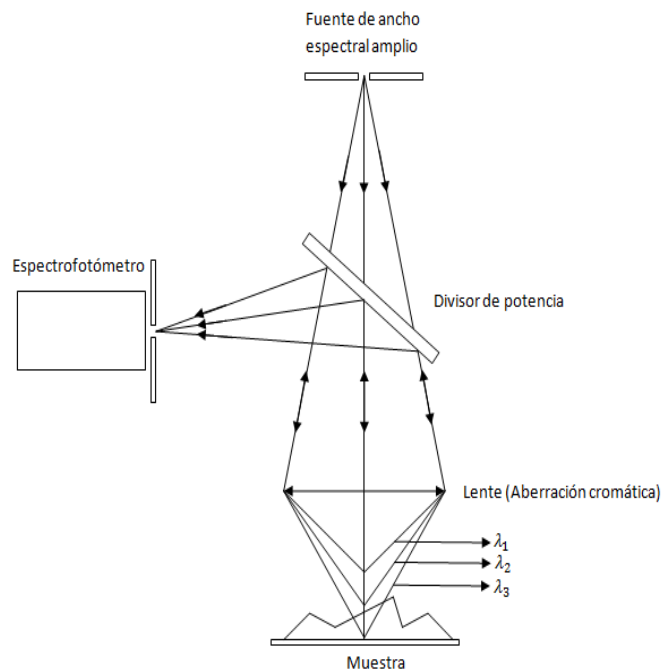


Figura 1.9. Microscopio confocal policromático.

Por lo tanto cada punto de enfoque a lo largo del eje óptico, es un punto de la imagen y que representa una longitud de onda específica. La resolución de este tipo de instrumentos se relaciona con la magnitud de la dispersión cromática. La mayoría de las aplicaciones de formación de imágenes buscan evitar este tipo de efectos provocados por las lentes. Sin embargo en este trabajo dicho fenómeno se le observa como una ventaja al momento de escanear una muestra de forma axial.

1.5.2.1 Microscopia confocal con fuente supercontinua multiplexada por división de longitud de onda

El trabajo se publicó en el año de 2006 por el Departamento de Ingeniería Eléctrica de la Universidad del estado de Pennsylvania en EE.UU. [14]. Los autores proponen el diseño de un microscopio confocal mediante el uso de una luz blanca generada por una fuente de supercontinuo, logrando obtener imágenes confocales en 3D, con una resolución axial de $3.6 \mu\text{m}$ y un barrido efectivo en profundidad de más de $180 \mu\text{m}$.

Mencionan que la microscopia confocal se ha convertido en una poderosa herramienta para una amplia gama de aplicaciones de ingeniería y biología debido a su capacidad única de seccionamiento óptico. Sin embargo una de sus principales desventajas es que la microscopia confocal convencional requiere de una exploración punto por punto que da como resultado una velocidad de adquisición de imágenes lenta. En este trabajo se aprovecha la aberración cromática para realizar una exploración axial de manera efectiva al enfocar diferentes longitudes de onda en diferentes planos que conforman a la muestra.

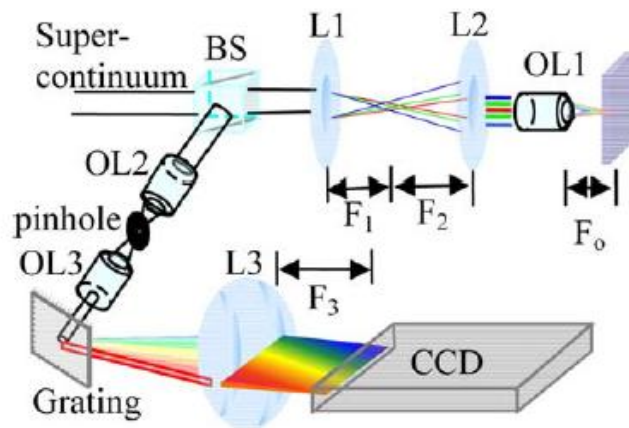


Figura 1.10. Diagrama esquemático del microscopio confocal axial WDM; OL1, OL2, OL3 (lente objetiva); BS, divisor de haz; L1, L2, L3 lente singlete [14].

En este artículo proponen un sistema confocal para la adquisición de perfiles de superficies en 3D. En la figura 1.10 se muestra el principio básico de su montaje donde las diferentes longitudes de onda de la fuente se enfocan a diferentes ubicaciones espaciales, permitiendo interrogar múltiples puntos de la muestra en paralelo. En el montaje planteado por los autores, el haz de la fuente de supercontinuo se enfoca mediante lentes "singlete" cuya longitud focal es una función de la longitud de onda debido a la dispersión cromática del material de la lente (vidrio BK7) [9]. Luego se transmite a la muestra mediante el uso de un sistema telescopio, que consiste en otra lente "singlete" (para aumentar aún más la aberración cromática) y una lente objetivo. Como resultado, diferentes longitudes de onda del supercontinuo se enfocan a diferentes posiciones axiales. La luz reflejada se vuelve a colimar por la misma óptica, posteriormente, se filtra espacialmente mediante el uso de un pinhole. Finalmente, se

dispersa mediante una rejilla y el espectro es capturado por una cámara CCD. Dado que cada longitud de onda interroga una posición axial diferente en la muestra, la información de profundidad se puede obtener en paralelo analizando el espectro registrado, uno de los principales resultados obtenido por los autores fue el que se muestra en la figura 1.11.

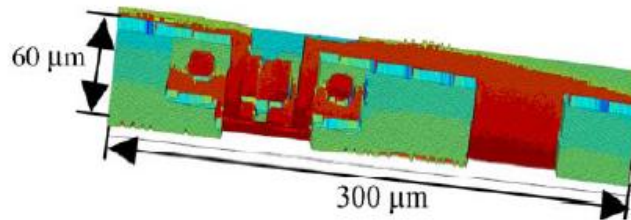


Figura 1.11 Perfil 3D de un FET utilizando el microscopio confocal policromático [14].

La imagen 3D de una muestra la pudieron obtener escaneando sólo en las direcciones laterales. Asimismo utilizaron un espejo como muestra de prueba y lo desplazaron mecánicamente en la dirección axial. Determinaron que el ancho de banda extremadamente amplio del supercontinuo les permitió un amplio rango de exploración, mientras que la alta coherencia espacial que obtuvieron les dio como resultado una alta eficiencia en la iluminación y una relación señal/ruido alta comparada con otras técnicas.

1.5.2.2 Microscopia confocal cromática para la obtención de imágenes a profundidad del tejido epitelial.

El artículo [15] fue publicado en el año de 2013 por el Departamento de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Texas en EE.UU. En este trabajo se propone un microscopio confocal cromático capaz de generar imágenes de reflectancia volumétrica de la microestructura de un tejido epitelial opaco. Aprovechando la aberración cromática de las lentes para formar planos axiales y eliminar la exploración mecánica axial que es difícil de implementar en la endoscopia. Obtuvieron un dispositivo capaz de analizar tejido con un grosor de más de 150 μm y con una resolución axial de 3 μm, logrando adquirir las primeras imágenes confocales que exhibieron la profundidad de una imagen in vivo, que permitió resolver morfología celular.

Los autores mencionan que tanto la microscopia confocal como la tomografía de coherencia óptica (OCT) y sus combinaciones, son las principales modalidades de imagen óptica basadas en reflectancia volumétrica de alta resolución que fueron exploradas para la detección temprana del cáncer en tejido epitelial. Estas técnicas pueden proporcionar información morfológica y arquitectónica en la escala tisular, celular y subcelular de las propiedades de dispersión de la luz y de las diferencias en el índice de refracción presentes en la muestra bajo estudio. En este artículo proponen un prototipo que se muestra en la figura 1.12, donde emplearon una fuente de amplio ancho espectral, formado con una fibra de cristal fotónico (PCF) iluminada con un láser de Ti: zafiro a 800 nm. Después hay una lente de colimación (CL), un divisor de haz de 45:55 (BS), que

refleja la luz en la trayectoria de la imagen óptica, posteriormente hay el arreglo de lentes (L1, L2, L3 y L4) que se conforma por 4 lentes esféricas que contribuyen a la aberración cromática y siendo corregidas en la aberración esférica. En la figura 1.13 se muestran cuatro planos confocales obtenidos a través del sistema.

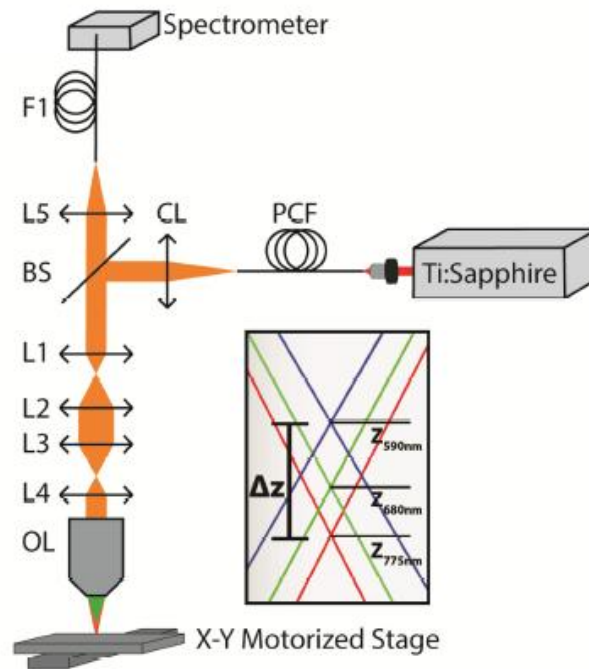


Figura 1.12. Diagrama esquemático de un microscopio confocal policromático para el análisis de tejido biológico [15].

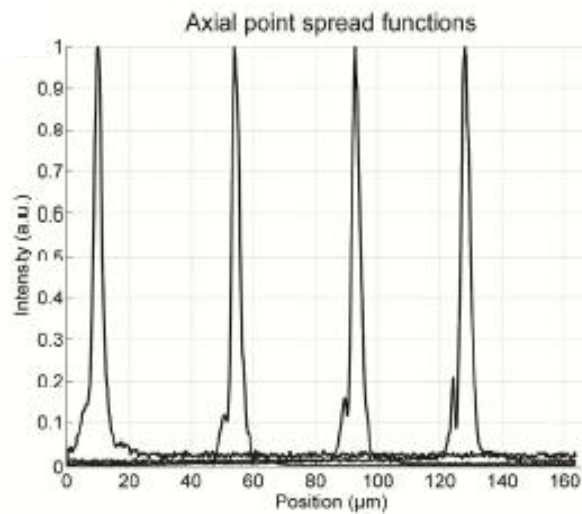


Figura 1.13 Planos axiales a 10, 50, 90 y 130 μm de profundidad a longitudes de onda de 595, 635, 675 y 725 nm, respectivamente [15].

Las principales aportaciones que tiene este trabajo a la microscopia confocal es el de incorporar lentes esféricas para la dispersión cromática y la utilización de detección espectroscópica para capturar simultáneamente las señales confocales de reflexión para los diferentes planos axiales en un rango axial de 157 μm en el tejido. En la figura 1.14, se observa una imagen volumétrica de células en epitelio oral de cerdo. Si bien la velocidad de escaneo de la imagen que obtuvieron es lenta, la capacidad de capturar datos de imágenes confocales de reflectancia volumétrica sin exploración axial mecánica es atractiva en aplicaciones clínicas de endoscopia debido a la estructura reducida que tienen estos dispositivos, presentado una importante mejora ya que la mayoría de los diseños de endoscopios confocales actuales solo recogen imágenes en 2D o utilizan mecanismos de escaneo axial relativamente lentos.

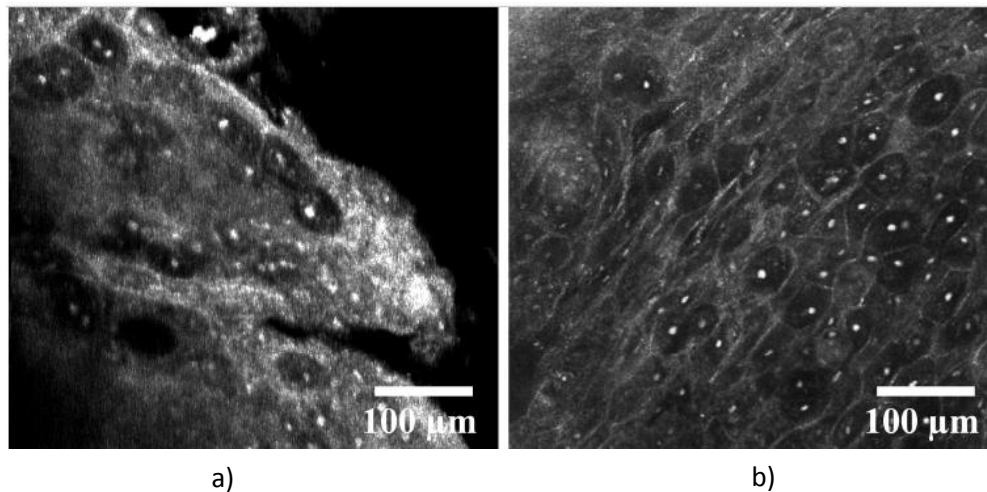


Figura 1.14. a) Imagen del video CCM de la mucosa bucal porcina en comparación con b) una imagen del mismo tejido del microscopio confocal propuesto [15].

1.5.3 Microscopio confocal cromático (MCC)

Esta propuesta tiende a ser comparada con el principio descrito en la sección 1.5.2, sin embargo a pesar que tienen la misma propuesta a nivel diseño y que utilizan la aberración cromática como un fenómeno beneficioso para el escaneo de muestras en forma axial, su principal diferencia radica en la interpretación de la información adquirida. Para el caso del policromático no se busca relacionar la información obtenida con algún color o tono al momento de realizar una reconstrucción del elemento bajo estudio; mientras que con el confocal cromático, se utiliza una curva de calibración que relaciona intensidad, profundidad con color o tono, que ayude a realizar una reconstrucción topográfica a color de la muestra, porque el color es una sensación, no una interpretación física, lo que genera que existan muchas propuestas acerca de cómo realizar una interpretación cromática de las muestras.

A continuación se plantea un artículo que hace referencia a este tipo de análisis de información con un método cromático, su principal aportación radica en la creación de tres tipos de intensidades, formando tonos y que lo combinan con análisis espectral.

1.5.3.1 Detección de imágenes tridimensionales mediante microscopía confocal cromática.

En el año de 1994 se publicó el trabajo [16], por el Instituto de Tecnología Técnica de Stuttgart en Alemania, donde sus autores proponen que debido a la aberración cromática axial deliberadamente introducida en el objetivo del microscopio, donde la ubicación del plano focal dependerá de la longitud de onda utilizada, con el uso de una fuente de luz blanca se logró examinar objetos a profundidad, permitiendo resolver N planos que conforman a la muestra, donde observaron que estos presentan nitidez y brillo indicando su grado de confocalidad. Por lo tanto para cada tono de color, se le pudo asignar una altura utilizando una curva de calibración. Para esta asignación buscaron que fuera inequívoca mediante la selección de filtros.

En este artículo se enfocaron en la reconstrucción tridimensional de la información adquirida en un microscopio confocal cromático, ya que este tipo de dispositivos presentan una discriminación en profundidad, como ya se mencionó. Asimismo la formación de dichas imágenes, las partes ubicadas dentro del plano bajo estudio aparecen nítidas y brillantes, mientras que las partes fuera del plano aparecen oscuras y borrosas. Ellos describen un método cromático para mediciones confocales, que se basa en el registro de profundidad por codificación de color, donde la altura se revela por los cambios de intensidad. Mencionan que la presencia de ambigüedad se produce al menos entre dos alturas, ya que se observa superposición en las longitudes de onda, por lo tanto para lograr una buena detección inequívoca de la topografía se requiere tres colores que les permitió una mejor codificación además una resolución alta.

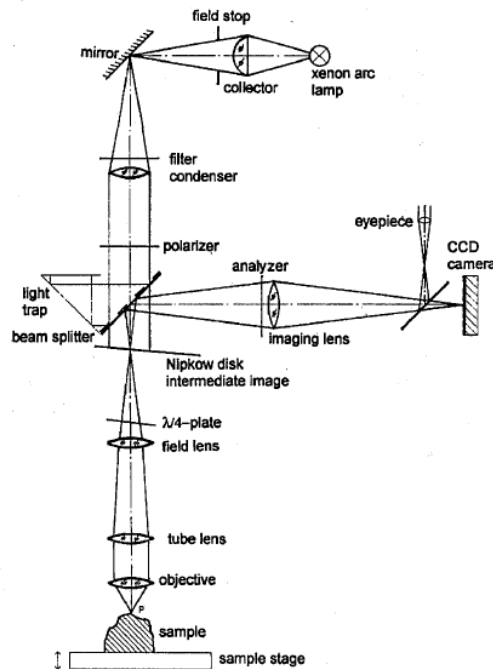


Figura 1.15. Configuración experimental del microscopio confocal con fuente de amplio ancho espectral [16].

Los autores proponen un diseño de MC como el que se muestra en la figura 1.15, donde hacen uso de elementos de la propuesta original hecha por Minsky agregando deliberadamente la aberración cromática al prototipo, que les permitió obtener información y poder realizar una reconstrucción en 3D. Toda la información tridimensional adquirida del objeto se obtiene de manera paralela, grabando la imagen en una película en blanco y negro, además con el método que proponen ya no es necesario combinar la imagen de enfoque automático de forma sintética en 256 secciones de altura, siendo una gran ventaja cuando se necesita desplazamiento axial en el análisis del objeto.

Para determinar la información de altura de una sola imagen, la analizaron como una imagen en color, en la que se asigna una altura a cada píxel. Un método que les permitió diseñar la codificación de color y que la encontraron mediante análisis espectral. Sin embargo, entienden que la descripción del color no es una cantidad física sino más bien una impresión sensorial, que surge en el ojo y el cerebro, por lo tanto mencionan que solo la distribución de intensidad espectral de esa luz entrante es físicamente descriptible. Para determinar la distribución de intensidad espectral completa de cada punto del objeto les resultó un trabajo bastante exigente. Entonces crearon tres tipos de intensidades S1, S2 y S3, basándose en la interpretación tridimensional.

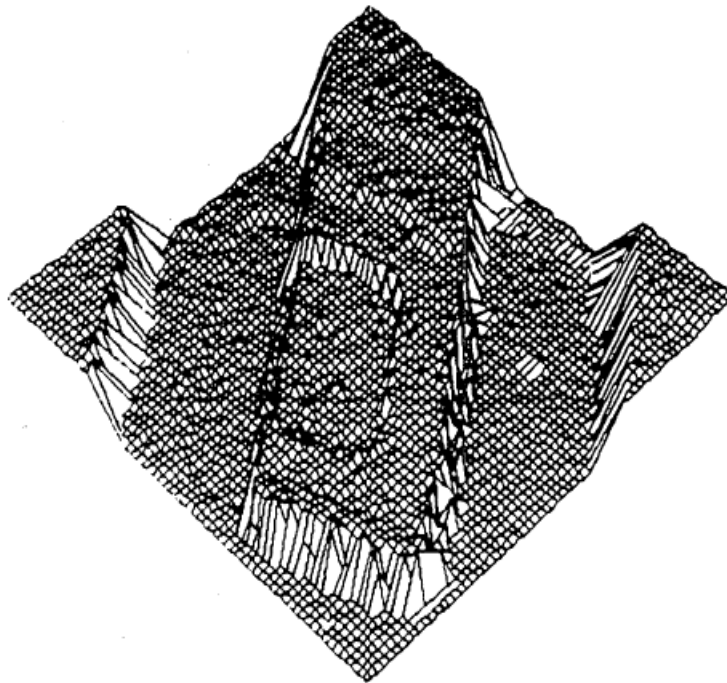


Figura 1.16 Topografía de un microchip resultado del método cromático [16].

Realizaron una calibración donde dependiendo de la posición z de un espejo colocado como muestra, la imagen tuvo diferentes tonos de color, es decir, cada tono de color indica una cierta altura de la parte de superficie medida. Al medir un objeto, hallaron que después de determinar el tono de cada punto, esta asignación debe ser inequívoca, en la

figura 1.16 se muestra un perfil de superficie, demostrando que la microscopía confocal es apropiada para la determinación de la topografía con alta resolución lateral y axial, mediante el procesamiento paralelo a través del método cromático.

1.6 Microscopio confocal en fibra óptica

En la actualidad el uso de componentes de fibra óptica como elementos de iluminación y detección de microscopios confocales comerciales ha ido en aumento, Teniendo como consecuencia el desarrollo de diseños completamente nuevos en microscopios confocales altamente compactos que fueron posibles gracias a la tecnología de fibra óptica.

Sin duda la invención y la producción de fibra óptica más especializadas y de dispositivos con este tipo de material han aumentado la oportunidad de reemplazar muchos de los componentes ópticos que conforman a un microscopio confocal tradicional, cumpliendo con funciones clave dentro de este tipo de instrumentos, mejorando incluso su rendimiento y capacidades.

1.6.1 Funciones clave de la fibra óptica en los microscopios

El uso de la fibra óptica en diferentes dispositivos en la actualidad es explotada en muy buena manera ya que es empleada en sistemas confocales, escáneres OCT, microscopia no lineal de escaneo láser, entre otros. En muchos de los casos se busca eliminar algunos elementos pesados o de grandes dimensiones, problemas de alineación, haciendo portables los sistemas desarrollados. El uso de fibra óptica en la MC aporta:

- Mayor facilidad de guiado de luz desde la fuente hasta el extremo de salida con la señal de inspección
- Proyección eficiente de la luz de retorno sobre una fibra que actúa como apertura de detección en el detector
- Transmisión de pulsos cortos para microscopia no lineal

Asimismo, en la actualidad el uso de fibras ópticas como sistemas flexibles para el suministro de luz láser ha demostrado que es particularmente útil en el campo de la medicina, debido a que ofrece ventajas como el aislamiento de equipo voluminoso, inmunidad a vibración, la flexibilidad para canalizar y manipular realmente la salida del láser. En la figura 1.17 se observa un esquema donde se hace uso de la fibra óptica dentro de la microscopia confocal, donde sustituye al divisor de haz que permitió eliminar problemas de alineación y vibración. Está conformado por todos los elementos de un MC tradicional: un láser, un detector, un sistema de lentes para el escaneo de la muestra, además de un control de escaneo para mover la muestra.

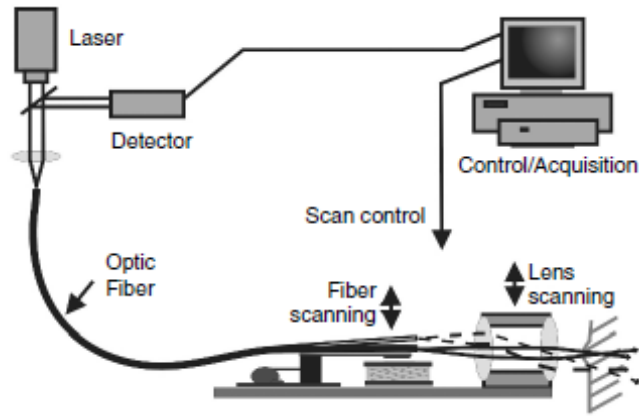


Figura 1.17. Esquema de un MC donde se hace uso de fibra óptica [16].

La exploración del uso de fibra multimodo para el suministro de láser, es un área de poco estudio en los sistemas confocales, debido a que los diferentes modos actuarán como una serie de fuentes de luz, cada uno de los cuales se visualizará en un punto separado dentro de la muestra. Aunque cada uno de los diferentes modos individuales mantendrá su coherencia, la salida general será la suma de todos los modos propagados, la principal diferencia es que la salida no puede restaurarse en un solo frente de onda ni enfocarse en un punto limitado, como sucede en la fibra monomodal. A continuación se presentan dos artículos donde se proponen diseños con base al uso de fibra óptica, presentando varias ventajas con respecto a los sistemas confocales tradicionales, haciéndolos más compactos y dándole incluso otro tipo aplicaciones dentro de la instrumentación.

1.6.1.1 Microscopio confocal de fibra óptica: FOCON

El artículo [17] fue publicado en 1992, fue hecho en el Laboratorio de Sydney en Australia. En este trabajo se plantea el diseño de un microscopio confocal de fibra óptica reflectante, que recibe el nombre de FOCON. Propone el uso de un acoplador de fibra óptica para sustituir un divisor de haz y el filtrado espacial se realiza a través de la fibra óptica, obteniendo resoluciones de un microscopio confocal convencional, para la realización de un escaneo en tres ejes (x , y , z).

Los autores mencionan que las dos principales áreas de mejora potencial, son el uso de diferentes tipos de fuentes y el filtrado espacial. En este trabajo proponen reemplazar algunos elementos simples del microscopio confocal por elementos de fibra óptica, ya que presenta las mismas características, como en el caso del diafragma o filtro espacial, teniendo como resultado un microscopio confocal mucho más simple, como se muestra en la figura 1.18.

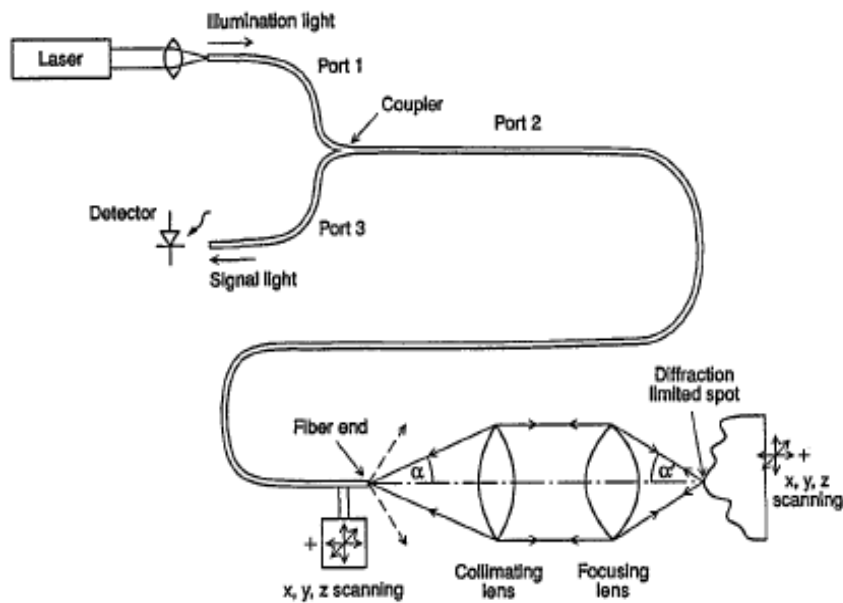


Figura 1.18. Diagrama esquemático del diseño microscopio confocal con fibra óptica [17].

Explican que en funcionamiento, la iluminación de la fuente láser de $\lambda=632$ nm se inyecta en el puerto 1 del acoplador de la fibra monomodo 2x1 y emerge por el puerto 2 del acoplador, donde este último actúa como una fuente de luz monocromática con un perfil de intensidad aproximadamente gaussiano. La lente de colimación recoge parte de esta luz y la enfoca en un punto limitado por difracción mediante una lente de enfoque de alta calidad. Experimentalmente llegaron a la conclusión en esta sección, que si la apertura numérica de la lente de colimación coincide o es mayor que la de la fibra, se captura la mayor parte de la luz que emerge de esta y se maximiza el rendimiento de la luz del microscopio. Sin embargo esto no resultó en una operación confocal, porque recibe información adyacente al punto de interrogación. Por último la luz de la señal es dispersada y reflejada por un objeto, siendo recogida por la lente de enfoque, para después ser inyectada por la lente de colimación en el núcleo de la fibra del puerto 2 del acoplador y parte de esta luz se dirige al puerto 3 donde es detectada.

Una de las principales características que se dedicaron a resolver en este trabajo fue el grado de confocalidad presente en el diseño, donde destaca el filtrado espacial hecho por la fibra óptica del acoplador. Para ello analizaron tres casos: cuando la apertura numérica de la fibra era mayor que la apertura numérica del colimador, cuando ambas eran iguales y cuando la apertura numérica del colimador era mayor a la de la fibra óptica. Determinaron que el último caso presentó los mejores resultados debido a que tenía la mejor señal en el detector con cierto grado de confocalidad, además mencionaron que el FOCON es más simple y menos robusto que los microscopios confocales convencionales. La combinación de menos componentes y la construcción mecánica mucho más simple no sólo les proporcionó un microscopio más confiable y compacto, sino que también les ofreció un potencial de menor costo. Además, debido a la sustitución de los núcleos de fibra monomodo por orificios convencionales (apertura circular), FOCON puede operar de manera más confiable en un ambiente sucio.

1.6.1.2 Expandiendo el ámbito de la detección confocal de fibra óptica para el sensado de la posición, el desplazamiento y la velocidad.

El artículo [18] fue realizado en el año de 2006 por la División Electro-Óptica por el Centro de Investigación Nuclear Soreq en Israel. En el trabajo se describe un sistema de sensor confocal de fibra óptica (FOCOS) que utiliza este elemento como un dispositivo para detectar con precisión la posición de un objeto en el plano de una imagen, donde las características de la fibra óptica les permitió definir el alcance y la precisión del sensor, donde mediante el uso de múltiples longitudes de onda lograron hacer mediciones de posición y desplazamiento, agregando el análisis de velocidad como un valor adicional a su sistema.

Los autores remarcan que la técnica de microscopia confocal de alta resolución también se puede adaptar para aplicaciones de detección de desplazamiento. Una aplicación común es en la obtención de contorno de la superficie o mejor conocida como perfilometría, donde el sensor escanea lateralmente una superficie, donde se requiere un ajuste que proporcione siempre una señal confocal máxima en cada posición de análisis. Cuando la luz que emerge de la punta de una fibra óptica es dirigida o enfocada por una lente hacia un objeto, la misma lente puede actuar como "confocal" al recolectar la luz reflejada o dispersada desde el objeto hacia la fibra. Este proceso es más eficiente cuando el objeto está ubicado precisamente en el plano de la imagen, y la eficiencia disminuye cuando el objeto se desplaza, en cualquier dirección, desde el plano de la imagen. Por lo tanto la intensidad de la luz reflejada en la fibra es una función del desplazamiento en z del objeto desde el plano de imagen. Entonces determinaron que para recuperar la posición del objeto lo debían hacer con base en la intensidad de la luz reflejada en la fibra, es decir, un sensor de intensidad directa.

Como resultados experimentales proponen varios diseños: fibra monomodo y longitud de onda única, confocal de fibra óptica con posición múltiple, principio multifibra, principio longitud de onda múltiple y un sensor de fibra óptica multifocal. Los que mostraron destacados resultados fueron las últimas dos configuraciones, donde el principio de longitud de onda múltiple, como su nombre lo indica utiliza varias longitudes de onda provocadas por la dispersión cromática en la óptica de enfoque. Donde el punto focal varía a lo largo de z , que creará una imagen distinta para cada longitud de onda, convirtiendo el análisis de las muestras de puntuales a algo paralelo, dando un enfoque de uso más simple y con una discriminación espectral incorporada. El montaje empleado se muestra en la figura 1.19, donde se utilizaron seis fuentes láser de longitud de onda desde 532 nm hasta 1531 nm, donde el pico se desplaza hasta 700 μm , permitiendo interrogar muestras de hasta 1 mm de grosor, en la figura 1.20 (a) se muestran los 6 planos confocales caracterizados.

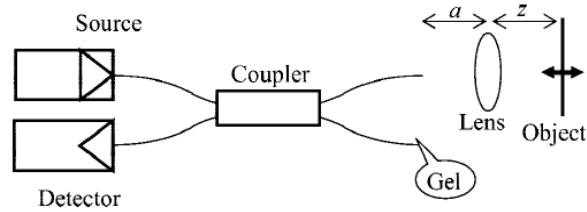


Figura 1.19. Configuración FOCOS para probar y demostrar la técnica microscopia confocal como sensor [18].

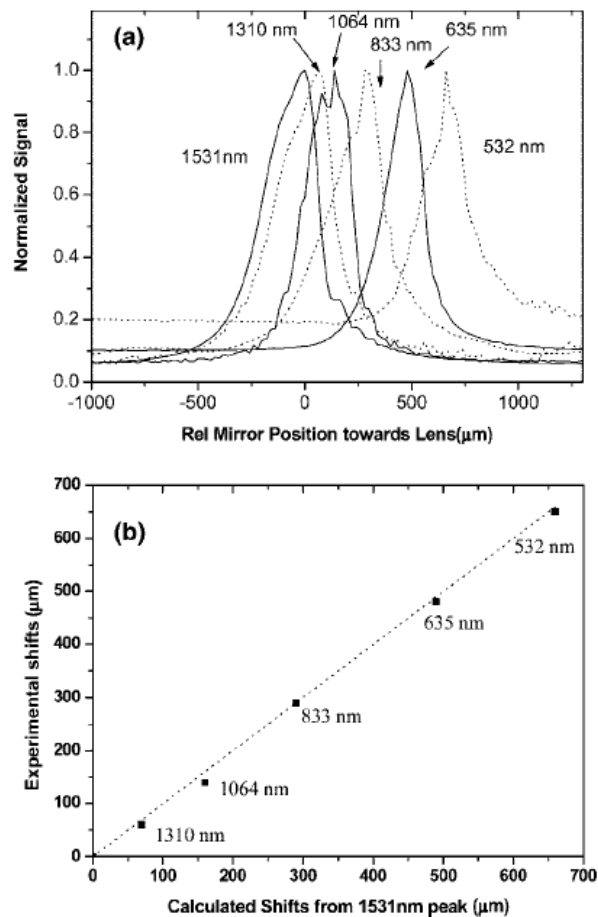


Figura 1.20. (a) Espectros de los planos confocales en función de la posición del espejo. La posición de referencia cero es la fuente de 1531 nm. (b) Gráfica de los cambios observados experimentalmente de cada longitud de onda frente a los cambios calculados [18].

Para el segundo diseño donde se muestra el diseño de un sensor de fibra óptica con posición múltiple, este sensor mide la velocidad en una dirección paralela al eje óptico, donde describen que su montaje se encuentra conformado por dos fibras y un electroimán que impulsa una palanca, a la cual se le montó una placa metálica reflectante, cuando la palanca fue propulsada por el electroimán se registró en el osciloscopio una señal como la que se muestra en la figura 1.21, donde determinaron que la distancia entre picos

corresponde a la velocidad promedio. A pesar de que fue una simple demostración tuvieron como resultado una incertidumbre del 4%, permitiendo verificar que este experimento es idóneo para la medición de velocidad y que contempla aplicaciones para la medición de movimiento de hasta velocidades balísticas.

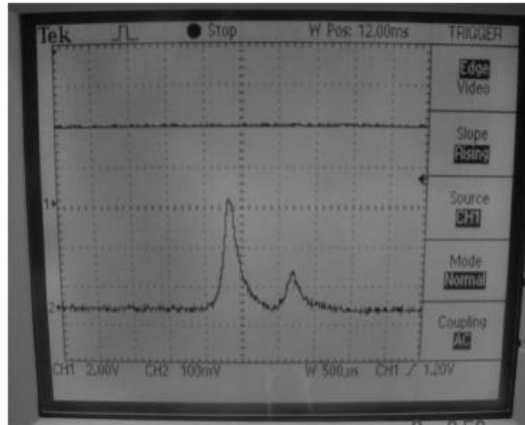


Figura 1.21. Señal adquirida en un osciloscopio utilizando el sensor FOCOS para el experimento de velocidad [18].

Los autores determinaron que el diseño propuesto de un sensor confocal de fibra óptica, puede desplegar múltiples fibras y múltiples longitudes de onda para interrogar distintos puntos de una muestra y donde las aplicaciones para mediciones de posición, desplazamiento, vibración y velocidad son factibles.

1.7 Propuesta de Microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica

Con los conceptos introductorios del tema antes analizados, se necesita formar una hipótesis sobre el trabajo propuesto y que a lo largo de los siguientes capítulos se buscará demostrar. Se propone el desarrollo de un microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica, donde se interroga diferentes planos de una muestra aprovechando la aberración cromática de las lentes presentes en el rango visible, donde se deberá alcanzar resoluciones micrométricas, la eliminación del movimiento axial, eliminación del pinhole como filtro espacial y la formación de perfiles de las muestras que se desean estudiar, donde se hará hincapié en la adquisición de información acerca de las dimensiones que conforman a dichos elementos, permitiendo determinar la viabilidad del dispositivo en el análisis de diferentes tipos de materiales y que ayude a establecer el trabajo a futuro que potencialice el diseño y desarrollo para su uso en el sector biológico que permita la caracterización de diferentes tipos de tejidos, área de estudio del grupo de dispositivos biomédicos del ICAT.

En este primer capítulo se presentaron las primeras valoraciones acerca de la microscopía confocal en sus diferentes diseños, donde se abordaron temas que permitieron definir el problema a resolver, como la adquisición de información de los diferentes planos que componen a la muestra y las dimensiones que la conforman,

permitiendo formar una hipótesis acerca de los principales resultados que se esperan obtener tanto en el diseño como en la formación de imágenes.

Referencias

- [1] H.-J. Jordan, M. Wegner, and H. Tiziani, "Highly accurate non-contact characterization of engineering surfaces using confocal microscopy," *Meas. Sci. Technol.* 9(7), 1142–1151 (1998).
- [2]. L. Yang, G. Wang, J. Wang, and Z. Xu, "Surface profilometry with a fibre optical confocal scanning microscope," *Meas. Sci. Technol.* 11(12), 1786–1791 (2000).
- [3]. J. Cohen-Sabban, J. Gaillard-Groleas, and P. J. Crepin, "Extended-field confocal imaging for 3D surface sensing," *Proc. SPIE* 5252, 366–371 (2004).
- [4]. J. R. Garzon, J. Meneses, G. Tribillion, T. Gharbi, and A. Plata, "Chromatic confocal microscopy by means of continuum light generated through a standard single mode fiber," *J. Opt. A, Pure Appl. Opt.* 6(6), 544–548 (2004).
- [5]. R. Juskaitis and T. Wilson, "Imaging in reciprocal fibre-optic based confocal scanning microscopes," *Opt. Commun.* 92(4–6), 315–325 (1992).
- [6]. E. Shafir and G. Berkovic, "Multi-wavelength fiber optic displacement sensing," *Proc. SPIE* 5952, 59520X (2005).
- [7]. G. Berkovic, E. Shafir, M. A. Golub, M. Bril, and V. Shurman, "Multiple-fiber and multiplewavelength confocal sensing with diffractive optical elements," *IEEE Sensors* 8(7), 1089–1092 (2008).
- [8] Shoude Chang, Youxin Mao, Costel Fluerau, and Sherif Sherif, "Optical coherence tomography: technology and applications", *Proc. SPIE* 7156, 715606 (2009).
- [9] Ruvalcaba Morales, Raúl.(2009). Desarrollo de un Microscopio Confocal para la obtención de imágenes en 3D de dispositivos desarrollados con microlitografía. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [10] García Aguilera, Marco A. (2015). Diseño y construcción de un microscopio confocal. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [11] J. B. Pawley, ed. (2006), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, (3rd ed.), Estados Unidos, Springer, p. 1-536.
- [12] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019) Introductory Confocal Concepts. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts>
- [13] Hyun-Joon Shin, Mark C. Pierce, Daesung Lee, Hyejun Ra, Olav Solgaard, and Rebecca Richards-Kortum, "Fiber-optic confocal microscope using a MEMS scanner and miniature objective lens", *Optics Express* 15(15), 9113-912 (2007).

- [14]. K. Shi, S. H. Nam, P. Li, S. Yin, and Z. Liu, "Wavelength division multiplexed confocal microscopy using supercontinuum," *Opt. Commun.* 263(2), 156–162 (2006).
- [15] Cory Olsovsky, Ryan Shelton, Oscar Carrasco-Zevallos, Brian E. Applegate, and Kristen C. Maitland, "Chromatic confocal microscopy for multi-depth imaging of epithelial tissue", *Biomedical Optics Express* 4(5), 732-740 (2013).
- [16]. H. J. Tiziani and H.-M. Uhde, "Three-dimensional image sensing by chromatic confocal microscopy," *Appl. Opt.* 33(10), 1838–1843 (1994).
- [17]. T. Dabbs and M. Glass, "Fiber-optic confocal microscope: FOCON," *Appl. Opt.* 31(16), 3030–3035 (1992).
- [18]. E. Shafir and G. Berkovic, "Expanding the realm of fiber optic confocal sensing for probing position, displacement, and velocity," *Appl. Opt.* 45(30), 7772–7777 (2006).

Capítulo 2. Diseño de un microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica (MCMLFO)

Como se mencionó en el anterior capítulo, la microscopia confocal ofrece varias ventajas sobre la microscopia óptica convencional, entre las que destacan la profundidad de campo y la capacidad de penetrar en las secciones ópticas de las muestras. La mayoría de los microscopios confocales actuales son relativamente fáciles de operar y se han convertido en parte de la instrumentación básica para la adquisición de imágenes en muchos laboratorios de investigación y de la industria.

En este capítulo abordaremos las diferentes etapas de diseño del microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica propuesto en este trabajo de tesis. Sus principales características, sus ecuaciones y modelos matemáticos para su análisis. Con los datos obtenidos propondremos el montaje experimental para su implementación.

2.1 Descripción de funciones dentro del sistema MCMLFO

El microscopio confocal propuesto se muestra en la figura 2.1, el cual se encuentra conformado principalmente por las etapas de: iluminación, colimación, enfoque, filtrado espacial y detección.

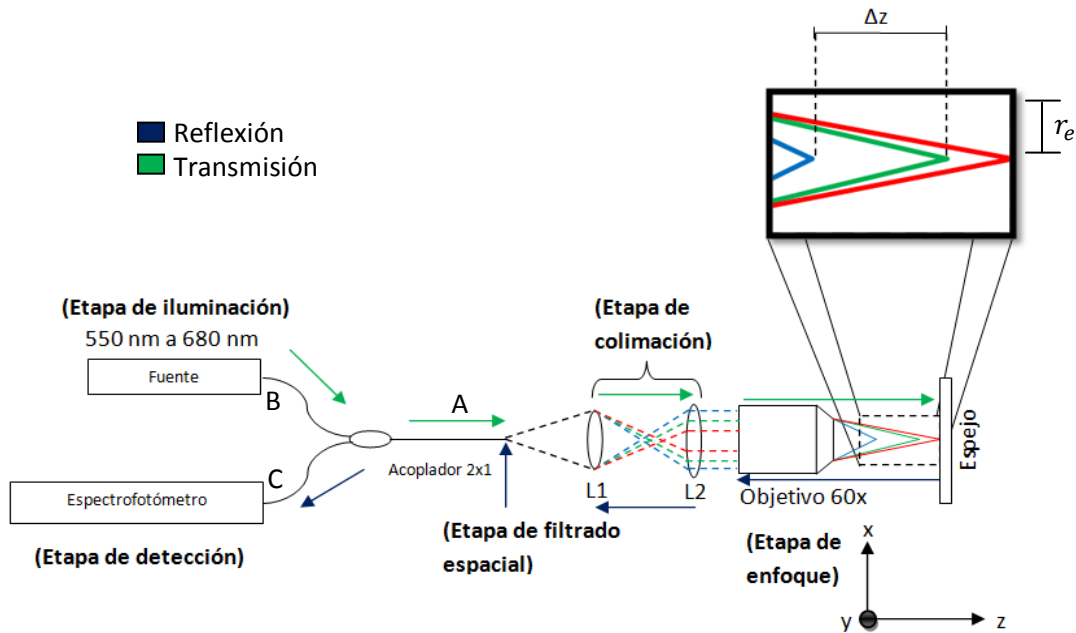


Figura 2.1. Diseño de un microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica - MCMLFO.

Para explicar su funcionamiento se presentan dos análisis de camino óptico: el de transmisión y el de reflexión. El primer estudio inicia con la etapa de iluminación, la cual se encuentra conformada por una fuente de ancho espectral amplio en el rango visible, de ella emerge luz que viajará a través del puerto B de un acoplador 2x1 en fibra óptica y saldrá por el puerto A, donde la luz que sale diverge, entrando a la etapa de colimación, la cual se encuentra conformada por dos lentes biconvexas (L1,L2), L1 enfoca y generará la

aberración cromática, L2 colima la luz que proviene de la primera lente generando un frente de onda plano que entra en la etapa de enfoque, en el cual se encuentra un objetivo que se encargará de enfocar la luz sobre la superficie de la muestra que se desea estudiar. Dentro de este estudio destacan dos parámetros: la resolución espacial (r_e) y axial (Δz). El primero es de importancia porque es un valor que nos indica cual es la distancia mínima que se debe de recorrer para que no exista traslape en la información interrogada. La resolución axial nos indicará la distancia mínima de separación que existe entre las diferentes longitudes de onda que permitirán interrogar a lo largo del eje focal las muestras, ambos conceptos serán tratados a profundidad más adelante.

Un fenómeno que se relaciona con este último parámetro, es la aberración cromática, de gran importancia en el diseño, ya que se plantea como una ventaja en la velocidad de escaneo de las muestras. Al ser dependiente de la longitud de onda y del índice de refracción del material de las lentes, enfoca cada longitud de onda en un punto diferente a lo largo del eje axial (z), permitiendo un escaneo en paralelo y que pueda ser codificado espectralmente.

Para el estudio en reflexión, la luz una vez enfocada reflejará parte de esta energía y regresará por el mismo camino óptico. Es decir, pasará por el objetivo, posteriormente por la etapa de colimación e ingresará de nuevo por el puerto A del acoplador, donde la fibra óptica cumplirá con la función de filtrado espacial, donde aquellos planos fuera de foco serán eliminados, donde conceptos como apertura numérica (AN) y el tamaño del spot (d_o) cobran relevancia en el diseño de este tipo de dispositivos. Debido a que un mal cálculo provocaría una interpretación errónea de la información, además de que se relaciona con la cantidad de luz captada en reflexión y la capacidad para evitar el paso de longitudes de onda fuera del rango de interés. Por último una vez que la luz ingreso al puerto A del acoplador, saldrá por el puerto C y un espectrofotómetro se encargará de analizar espectralmente el resultado, para su posterior análisis.

2.2 Análisis en transmisión

En un microscopio confocal clásico, se utiliza óptica tradicional en espacio libre, provocando que los diseños sean robustos y poco prácticos para ser transportados, sin embargo algunos elementos pueden ser sustituidos por dispositivos en fibra óptica. Esto permite que factores como la alineación y el tamaño del diseño se vean beneficiados, además de que cumplen con funciones clave dentro de este tipo de instrumentos, mejorando incluso su rendimiento y capacidades.

Para el diseño del MCMLFO se utilizará una fuente de amplio ancho espectral en el rango visible debido a que nos proporciona una gran cantidad de longitudes de onda, necesaria para la formación de los diferentes planos focales, fenómeno que nos interesa para poder interrogar de manera axial las muestras. Para nuestro sistema proponemos una fuente con una emisión en longitud de onda de 550 nm a 680 nm. Para caracterizar su respuesta espectral se conectó una fibra con transmisión de 8 a 18 modos en el rango visible (SMF-28 monomodal @ 1550 nm) a la fuente y con un espectrofotómetro (Edmund

Optics BRC112E-USB-VIS/NIR) se obtuvo el espectro de transmisión que se muestra en la figura 2.2.

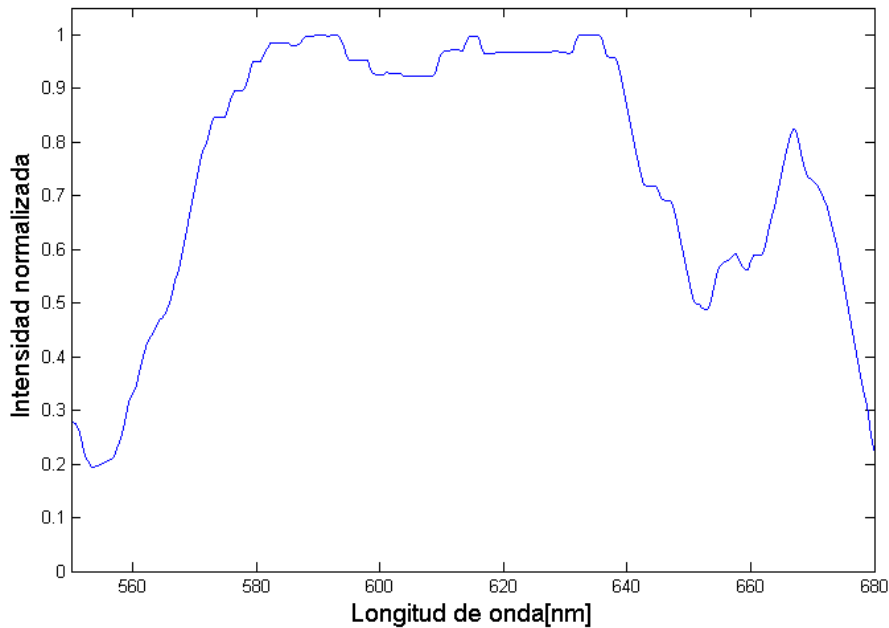
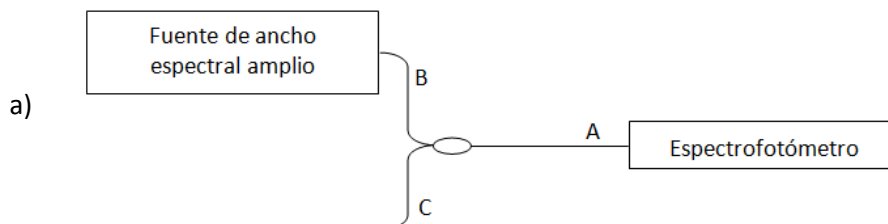


Figura 2.2. Respuesta espectral de la fuente de amplio ancho espectral a través de una fibra SMF-28.

Para la grafica de la figura 2.2 se normalizó la intensidad adquirida por el espectrofotómetro, con respecto a la intensidad máxima obtenida en el rango espectral de interés (550 a 680 nm).

Así mismo, como ya se mencionó existen dos análisis dentro de las etapas de diseño del MC, primero se estudiarán las etapas en transmisión, se analizará el acoplador 2x1 con un diámetro de núcleo de 9 μm , con una apertura 0.14 y el cual será caracterizado en el rango espectral antes mencionado. Este elemento permite tener brazos independientes, uno para la fuente que iluminará la muestra, otro para canalizar la luz hacia la muestra y un tercer brazo que analizará espectralmente en reflexión la información adquirida, eliminando problemas de alineación en el diseño. En la figura 2.3 se muestra un esquema de las dos evaluaciones que nos interesa realizar para determinar las pérdidas que induciría cada brazo al ser utilizado en el sistema. Dado que el acoplador propuesto será utilizado en el rango visible que va 550 a 680 nm, donde se caracterizó la transmisión de manera espectral, para el caso en incidencia se conecta la fuente en el puerto B y el espectrofotómetro en el puerto A. En la figura 2.3(a) se muestra el esquema para este estudio.



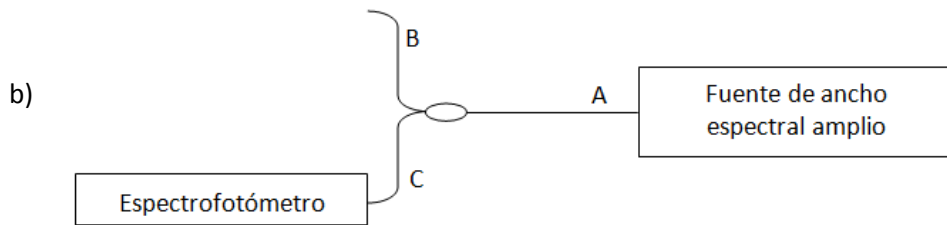


Figura 2.3. Esquema de las dos caracterizaciones que se le realizaron al acoplador 2x1: a) caso 1 (en incidencia) b) caso 2 (en reflexión).

En la figura 2.4 se muestra dos espectros: en color rojo se observa el espectro de transmisión del puerto A del acoplador 2x1 y en azul la salida del puerto C que corresponde al segundo caso (figura 2.3 (b)). Como se puede observar en ambas gráficas, se presentan pérdidas sobre todo en este segundo caso, por el tipo de fibra que se está empleando, es decir, estamos utilizando una fuente en el rango visible, el acoplador a caracterizar posee dimensiones que trabajan en el infrarrojo a 1550 nm y por ende tiene un coeficiente de acoplamiento diferente. El comportamiento en el rango en que deseamos trabajar es multimodal, teniendo una tasa de división diferente, presentándose como pérdidas dentro del acoplador, por lo tanto sé es consciente de que al usar este tipo de dispositivo se presentarían desventajas.

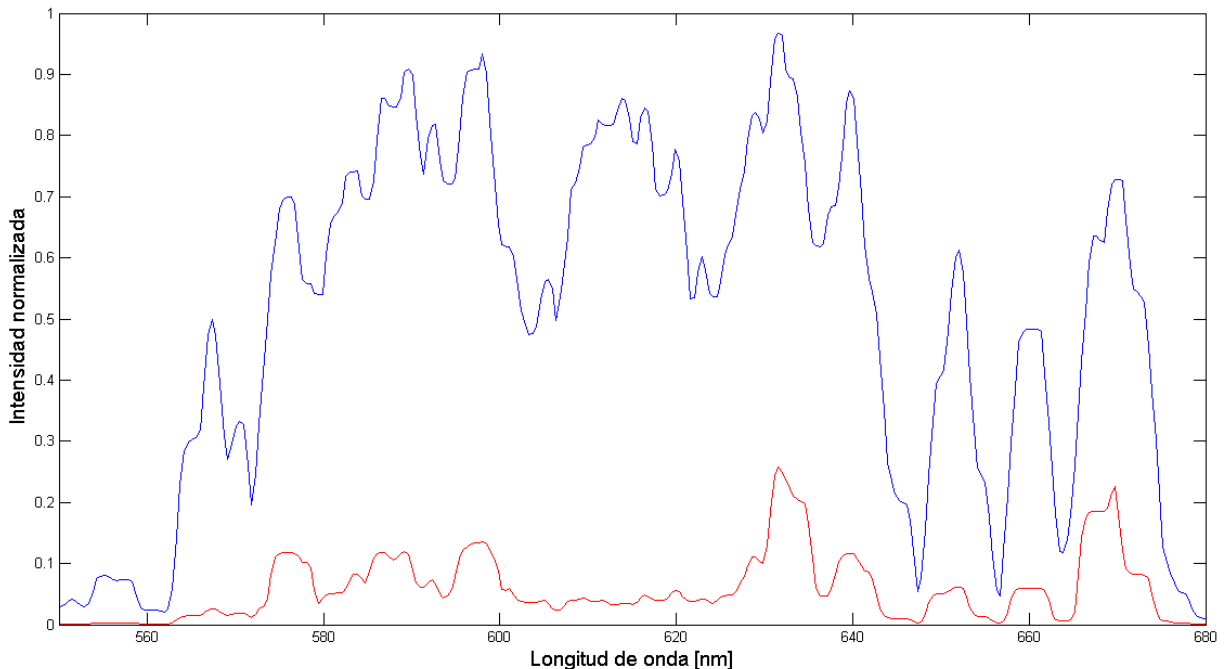


Figura 2.4. Espectros a la salida del acoplador 2x1: rojo (puerto C) y azul (puerto A).

La gráfica 2.4 fue también normalizada, se dividió con respecto a la intensidad máxima que se obtuvo en la figura 2.3 (empleada como referencia). A continuación se muestra en

la tabla 2.1 las intensidades y la tasa de división obtenidas en el caso 1, donde la fuente fue conectada en el puerto B y el detector en el puerto A.

Tabla 2.1. Caracterización del acoplador 2x1 en incidencia (caso 1).

λ [nm]	Intensidad [u.a.]		A/B [%]
	Canal B en incidencia	Canal A	
580	58595.19	38655.49	66
590	64223.55	57507.98	89
600	54893.49	39721.46	72
610	62792.24	50163.97	80
620	63879.03	48436.56	76
630	64008.10	52612.84	82
640	64229.73	54939.40	85
650	40474.90	26709.52	66
660	46126.79	30863.09	67
670	62069.25	46469.53	75

En la tabla 2.2 se muestran las intensidades y la tasa de división obtenidas en el caso 2, donde la fuente fue conectada en el puerto A y el detector en el puerto C.

Tabla 2.2. Caracterización del acoplador 2x1 en reflexión (caso 2)

λ [nm]	Intensidad [u.a.]		C/A [%]
	Canal A en incidencia	Canal C	
580	58595.19	3159.54	5
590	64223.55	5703.55	9
600	54893.49	3731.16	7
610	62792.24	2406.99	4
620	63879.03	3401.67	5
630	64008.10	8340.84	13
640	64229.73	7371.56	11
650	40474.90	3221.78	8
660	46126.79	3802.82	8
670	62069.25	11486.99	18

Con los resultados obtenidos en ambas tablas, podemos decir el comportamiento del acoplador presenta una tasa de división que va de 66% para una $\lambda = 580$ nm hasta 75% para $\lambda=670$ nm como se muestra en la tabla 1. Esto se debe a que el comportamiento del divisor tiene una fuerte dependencia a la longitud de onda dado que su funcionamiento está basado en un acoplamiento del campo modal en la zona de transición entre las fibras de entrada y salida [19]. Por lo tanto para el diseño de este trabajo se debe considerar que la ventaja de tener un dispositivo como el acoplador 2x1 de fácil conexión y que aporta estabilidad mecánica con la penalización de tasas de división variables según la longitud de onda. Para el caso 2, en reflexión, se tienen tasas de división que va de los

5% para una $\lambda=580$ nm hasta 18% para una $\lambda=670$ nm como se muestra en la tabla 2. Para determinar que puerto del acoplador 2x1 será utilizado para la vía de incidencia y para la vía de reflexión, se propone que la fuente sea conectada en el puerto B, porque en incidencia conviene enviar la mayor cantidad de luz posible a la muestra y en el camino de reflexión utilizar el otro puerto, donde la luz regresará por el puerto A y saldrá por el puerto C donde se encontrará conectado el espectrofotómetro, donde se hará evidente las pérdidas generadas por todo el diseño del MCMLFO.

Continuando con el estudio en transmisión, se analizará la etapa de colimación la cual se encuentra conformada por dos lentes biconvexas, primero se realizó el análisis de una sola lente para entender su comportamiento a lo largo del espectro visible y comprender la dispersión cromática presente en la lente, se procedió a realizar una búsqueda sobre los materiales presentes en la fabricación de estos elementos, haciendo uso de las ecuaciones (2.1) y (2.2), que permite analizar la distancia focal de las lentes con base en sus radios y material.[19-25]

$$\frac{1}{f} = (n_l - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (2.1)$$

y

$$\frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_i} = \frac{1}{f} \quad (2.2)$$

En la figura 2.5 se muestra un diagrama de una lente biconvexa y sus variables más importantes, como lo son f - foco, n_l - índice de refracción del material, $R_1 = -R_2$ que son los radios de la lente.[25]

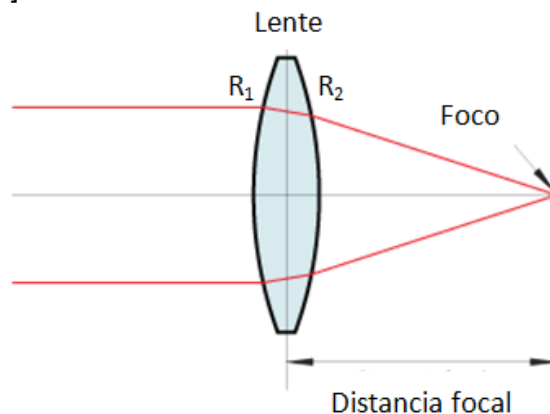


Figura 2.5. Esquema de una lente biconvexa.

Los materiales más usados en la fabricación de lentes son : BK-7, Sílice Fundida, SF5, SF10 y SF11, el que más destaca por su uso en la fabricación de lentes es BK7 principalmente. Entonces se procedió a realizar una simulación de la dispersión del índice de refracción con estos materiales para entender como es el comportamiento de cada uno a lo largo del espectro visible, rango donde se desea trabajar, para realizar lo anterior se

hace uso de la ecuación de Sellemeier (2.3), que permite entender la dispersión del índice de refracción (n), la cual se define como un fenómeno presente en el material de la lente, debido a que la luz atraviesa un medio, provocando una disminución en la velocidad de propagación, efectuada por la diferencia de índices de refracción y que depende de la longitud de onda.[25]

$$n^2(\lambda) = 1 + \frac{B_1\lambda^2}{(\lambda^2 - C_1)} + \frac{B_2\lambda^2}{(\lambda^2 - C_2)} + \frac{B_3\lambda^2}{(\lambda^2 - C_3)} \quad (2.3)$$

Donde λ es la longitud de onda, típicamente se utilizan ecuaciones analítica/empírica para modelar la dispersión de n y donde los coeficiente B_1, B_2, B_3, C_1, C_2 y C_3 son obtenidos de las caracterización de los materiales. En la tabla 2.3 se muestran los coeficientes de todos los 5 materiales resultado de la búsqueda antes mencionada.

Tabla 2.3. Coeficientes de los materiales: BK7, SF5, SF10, SF11 y sílice fundida [28-32].

Coeficientes	BK7	SF5	SF10	SF11	Sílice fundida
B_1	1.03931212	1.52481889	1.62153902	1.73759695	0.69616630
B_2	0.23179234	0.18708552	0.25628784	0.31374734	0.40794260
B_3	1.01046945	1.42729015	1.64447552	1.89878101	0.89747940
C_1	0.00600069	0.01125475	0.01222414	0.01318870	0.06840430
C_2	0.02001791	0.05889953	0.05957367	0.06230681	0.11624140
C_3	103.560653	129.141675	147.468793	155.236229	9.89616100

En la figura 2.6, se muestra el comportamiento de n en cada uno de los materiales a lo largo del espectro visible.

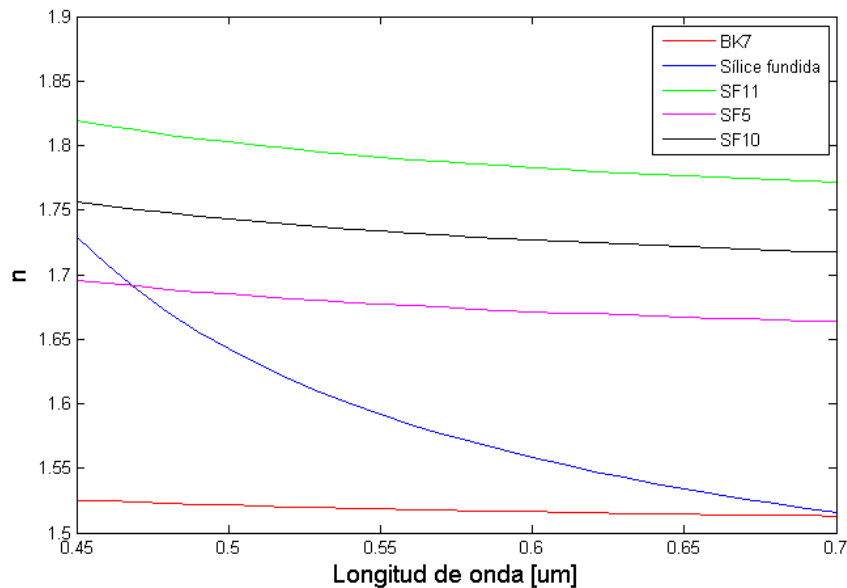
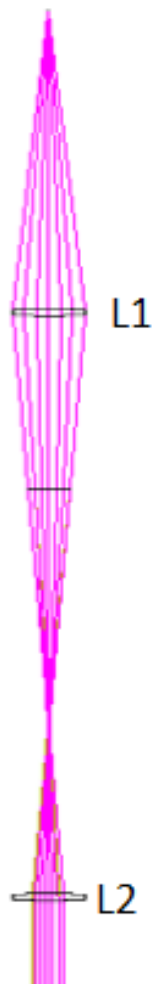


Figura 2.6. Dispersión de diferentes materiales en un rango de 450 a 700 nm.

Como se puede observar en la anterior gráfica, la sílice fundida es el que mayor dispersión presenta si la comparamos con los otros materiales, por lo tanto podría generar planos focales muy bien definidos y proporcionar mayor penetración. Sin embargo, esto implica una disminución en resolución axial en las muestras, por que los planos focales estarían muy separados entres sí, lo que implicaría perdida de información de varios planos, no cumpliendo con el objetivo planteado en este trabajo.

Se optó por un vidrio BK7 debido a que es uno de los materiales que se encuentra presente en la mayoría de las lentes, además de que cumple con los propósitos que se persiguen en el diseño, ya que permite obtener resoluciones axiales en micrómetros. La dispersión del índice de refracción al presentar un comportamiento exponencial decreciente. Nos indica que cada longitud de onda presentará una distancia axial distinta, es decir, no presenta una separación entre focos lineal, en donde las longitudes de onda más cortas (azules) se encontraran los planos focales mas separados, pero si se acerca a longitudes de onda más largas (rojos) se encontraran planos focales más juntos lo que provocaría que su búsqueda sea compleja.



Un fenómeno que comúnmente aparece en las lentes y que todo dispositivo óptico busca eliminar son las aberraciones, las cuales surgen del hecho que el índice de refracción es una función de la longitud de onda y por la forma curva de las lentes, provoca que se tengan imágenes borrosas, existen dos tipos: cromáticas y monocromáticas, nos centraremos en la primera, donde se sabe que el hecho de que la fuente posea un ancho de banda espectral amplio (luz policromática), ocasiona la aparición de aberraciones, donde diferentes rayos "de colores" cruzan el sistema con diferentes trayectorias enfocándose en diferentes puntos focales del eje óptico, denominado aberración cromática axial (ACA), donde la luz azul es la que más se desvía y la que más cerca de la lente se enfoca, como se muestra en la figura 2.7 [25].

Por lo tanto, una lente ideal enfocaría todos los colores de la luz en un mismo punto. En realidad, todas las lentes tienen aberración cromática y este defecto es aprovechado para interrogar diferentes planos de una muestra. Con los resultados y características analizadas hasta el momento, se plantea el uso de una lente que tiene un radio de 93 mm, material BK7 y un foco de 100 mm. Con ayuda del software Zemax, se realizará la simulación de toda la óptica que se planteó en el diseño del MCMLFO.

Figura 2.8. Esquema de la simulación realizada en Zemax.

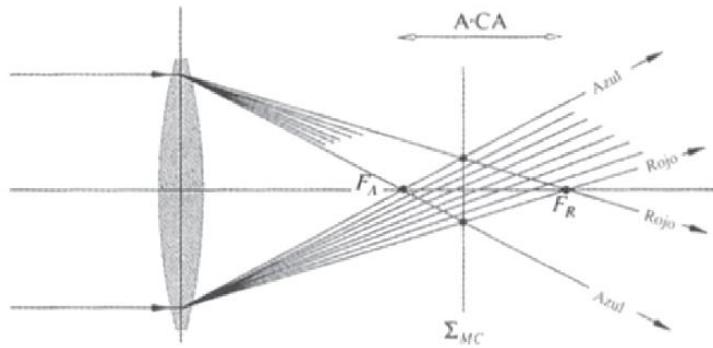


Figura 2.7 Esquema de la aberración cromática axial [25].

La etapa de colimación se encuentra conformada por dos lentes biconvexas que poseen las mismas características como ya se mencionó anteriormente, en la figura 2.8 se muestra el esquema de las dos lentes, L1 y L2 poseen un radio de curvatura (R_1 y R_2) de 93 mm, una distancia focal de 100 mm y un diámetro de 25 mm, parámetros que fueron usados en Zemax para la simulación del arreglo óptico propuesto en este trabajo, permitiendo conocer la resolución axial teórica en el rango de 550 nm a 680 nm.

El uso de L1 en el diseño es muy importante, porque es la que generará la aberración, pero de no tomarse en cuenta dentro del diseño, las longitudes de onda siempre se propagarían juntas, provocando que al interrogar un plano, cada longitud de onda tendría la misma información. Entonces una vez generada la aberración y al ser colimadas por L2, la separación continúa presente, y dicho fenómeno se sigue conservando en la siguiente etapa de diseño del MCMLFO.

Una vez que se cumplió con el objetivo de generar la aberración cromática y colimar las longitudes de onda, la siguiente etapa es la de enfoque, la cual también fue simulada en Zemax y cuyo objetivo es enfocar cada longitud de onda en un plano diferente de la muestra. Sin embargo, una de las características que interesan del diseño, es la resolución espacial que nos proporciona dicha etapa y la cual nos indicará cual es la distancia mínima que debemos recorrer para adquirir la información de un punto, sin que haya traslape de información.

La etapa de enfoque se encuentra conformada por un objetivo, para este diseño se empleará uno de 60x con una apertura numérica $AN = 0.85$, para calcular la resolución espacial (r_e) se emplea la ecuación 2.4. [26]

$$r_e = \frac{\lambda}{2 AN} \quad (2.4)$$

donde λ es la longitud de onda y AN la apertura numérica del objetivo, para el diseño de nuestro dispositivo, se sabe que se trabajará en un rango de 550 nm a 680 nm, en la tabla 2.4 se muestra la resoluciones obtenidas con los datos antes mencionados.

Tabla 2.4. Resoluciones en el rango de estudio de 550 nm a 680 nm.

Longitud de onda [nm]	Resolución [μm]
550	0.32
570	0.33
590	0.34
610	0.35
630	0.37
650	0.38
670	0.39
680	0.4

Con los resultados obtenidos podemos concluir que en el rango de longitudes de onda donde vamos a trabajar se tendrá una resolución de 0.32 μm a 0.4 μm , lo que me indica que con longitudes de onda más largas se tienen grados de resolución más bajos. Asimismo la resolución de un microscopio es la característica más importante del sistema óptico e influye en la capacidad para poder distinguir entre detalles finos en una muestra.

En la figura 2.9 se muestra el esquema de la simulación del arreglo de lentes y la etapa de enfoque. La distancia de L1 a L2 es de 120 mm y de L2 al objetivo de 40 mm. Hay que resaltar que el objetivo que se simuló se encuentra conformado con una sola lente, debido a que muchos de los artículos consultados recomiendan utilizar una lente respetando la *AN* del objetivo y sus dimensiones, porque un elemento real se compone de un arreglo bastante complejo de lentes de diferentes materiales y características. Por lo tanto, se busca evitar un análisis complejo, beneficiando las simulaciones y los resultados se acercan a lo más real posible.



Figura 2.9. Trazado de rayos con Zemax del arreglo de lentes conformado por la etapa de colimación y enfoque.

En la tabla 2.5 se muestran las distancias axiales teóricas obtenidas de la anterior simulación, partiendo de 580 nm como una referencia a una $z_{teo} = 0\mu\text{m}$. Lo anterior nos permite conocer el comportamiento de la aberración cromática y asegurar que la propuesta de diseño en este trabajo es bien planteada y puede funcionar para interrogar axialmente a las muestras, ayudando a conocer la resolución axial teórica que tiene el montaje y si cumple con uno de los objetivos del sistema: resolución axial micrométrica

Tabla 2.5. Resolución axial teórica.

Longitud de onda [nm]	z_{teo} [μm]
580	0

590	3.4
600	7.1
610	10.2
620	12.4
630	16
640	19.6
650	21.9
660	24.1

En conclusión con este primer análisis permitió determinar uno de los parámetros más importantes de un microscopio confocal, la resolución espacial la cual nos va a permitir conocer cuál es la distancia mínima que debe existir en el escaneo de una muestra sin que exista traslape de información. También se tuvo un primer acercamiento a través de las simulaciones al fenómeno de aberración cromática, el cual realizará el escaneo axial de los diferentes planos que componen a la muestra y que cumple con el objetivo de poseer resoluciones micrométricas. El siguiente apartado se enfocará en resolver cuando la luz es reflejada por la muestra y tiene que filtrar espacialmente aquellos planos fuera de foco, con ayuda de la fibra óptica del acoplador para después ser analizada por un espectrofotómetro.

2.3 Análisis en reflexión

Una vez que la luz reflejada en la muestra interrogó los diferentes planos, ésta pasa en sentido inverso hacia la etapa de enfoque y de colimado, es decir, regresa por la misma óptica del análisis en transmisión. Sin embargo, entre la etapa de colimación y la entrada del puerto A del acoplador 2x1, se filtrarán aquellos planos fuera de foco. Es decir, la fibra óptica funciona como filtro espacial dado que su diámetro y su cono de aceptación, toma relevancia porque el núcleo de la fibra óptica se encargará de filtrar aquellos planos focales que no tengan información del plano que se está interrogando, como se muestra en la figura 2.11, debido a que se tiene diferentes caminos ópticos resultando ángulos que no caen dentro del cono de aceptación de la fibra óptica, evitando una mala interpretación de la información, cumpliendo con la función del filtro espacial dentro del MC. Sin embargo al tener un comportamiento multimodal, la fibra óptica aceptará más luz, esperando tener un filtro espacial bastante grande.

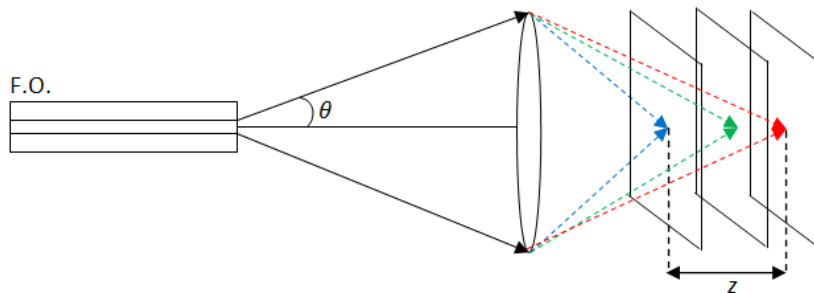


Figura 2.11. Filtrado espacial en la fibra óptica del puerto A en el MC.

Así mismo la apertura numérica de la fibra óptica, AN_f , toma relevancia, ya que relaciona los índices de refracción del núcleo (n_1) y revestimiento de la fibra óptica (n_2), indicando una medida de la capacidad de captación de la luz por parte de una fibra óptica y se define por la ecuación 2.4. [23]

$$AN_f = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} = n \sin \theta_1 \quad (2.4)$$

Para este caso el acoplador tiene las características de una fibra SMF-28, que posee un $n_1 = 1.4507$ y $n_2 = 1.444$ y haciendo uso de la ecuación 2.4, se obtiene $AN_f = 0.14$, y con una $n = 1$ (aire), nos indica que tiene un ángulo de:

$$\theta_1 = 8.04^\circ$$

El siguiente paso es calcular la apertura numérica de la lente, para comprender si la luz que proviene de este elemento es captada por la fibra óptica, para ello se hará uso de la ecuación 2.5. [25]

$$AN_L = \frac{1}{2 (f/\#)} = n \sin \theta_2 \quad (2.5)$$

donde $f/\#$ es la relación focal de la lente, de acuerdo a lo antes propuesto, se tiene una relación focal de 4 para la lente que empleamos en la propuesta, por lo tanto haciendo uso de la ecuación anterior, se obtiene $AN_L = 0.13$ y con $n = 1$ (aire) se tiene un ángulo de

$$\theta_2 = 7.46^\circ$$

Entonces al realizar la comparación entre AN_f y AN_L podemos deducir, que en la fibra óptica entrará la máxima cantidad de luz que emerge de L1 cuando se recibe información en reflexión, por que el ángulo del cono de aceptación la fibra óptica es mayor que el de la lente, indicando que los diámetros del haz del sistema óptico están dominados por la fibra y por ende se recupera la mayor cantidad de luz.

Asimismo es muy importante realizar el cálculo sobre las dimensiones que debe tener el filtro espacial (d_o) que evita el paso de planos focales fuera de la zona de interés, para ello se hará uso de la ecuación 2.6.[25]

$$d_o = \frac{1.22 \cdot \lambda}{AN} \quad (2.6)$$

En un rango de 550 nm a 680 nm y una AN de la lente de 0.13, y haciendo uso de la anterior ecuación, se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en la tabla 2.5.

Tabla 2.5. Diámetro del orificio en función de la longitud de onda

Longitud de onda [nm]	d_o [μm]
550	5.16
570	5.35
590	5.53
610	5.72
630	5.91
650	6.10
670	6.30
680	6.39

Con este resultado puedo decir que el spot que entrará a la fibra tendrá un valor entre 5 μm y 6.4 μm . Por lo tanto las dimensiones que posee la fibra óptica SMF-28 (9 μm) puede ser utilizado como filtro espacial. Sin embargo al tener un diámetro mayor a d_o , se recuperará información proveniente de otros planos y se convierta en ruido al momento de interpretar los datos. Además de que AN limitará la cantidad de luz que sea captada por la fibra.

Por lo tanto con el resultado obtenido, el uso del núcleo de la fibra óptica puede funcionar para el filtrado espacial como ya se mencionó, que a diferencia de usar una apertura como un pinhole, que es el elemento que se emplea con mayor frecuencia en el diseño de estos dispositivos. Tiene el problema que durante su fabricación en dimensiones micrométricas, su manufactura produce bordes no bien definidos y genera fenómenos como la difracción que provoca distorsión en la reconstrucción de la imagen.

La siguiente etapa es la detección, en la que se utiliza un espectrofotómetro, que va a permitir una detección simultánea de la señal de reflectancia desde todos los planos focales a lo largo de la línea de enfoque. La imagen se reconstruirá a partir de la intensidad de luz reflejada en cada punto escaneado de la muestra, no se asignará ningún valor ni color a los resultados.

Para interpretar los datos obtenidos del espectrofotómetro se propone un algoritmo que sea capaz de crear imágenes en 3D a partir de la luz reflejada de las muestras a analizar. Para esto se desarrolló en MATLAB un programa donde con todos los datos adquiridos del espectrofotómetro se procesan para obtener una topografía en 3D de las muestras. Este algoritmo funciona de la siguiente manera: se hace una revisión a todas las longitudes de onda dentro del rango especificado, se analizan todas las intensidades máximas encontrados y se guarda sus valores en una matriz, para después ser relacionados cada uno con su respectiva longitud de onda.

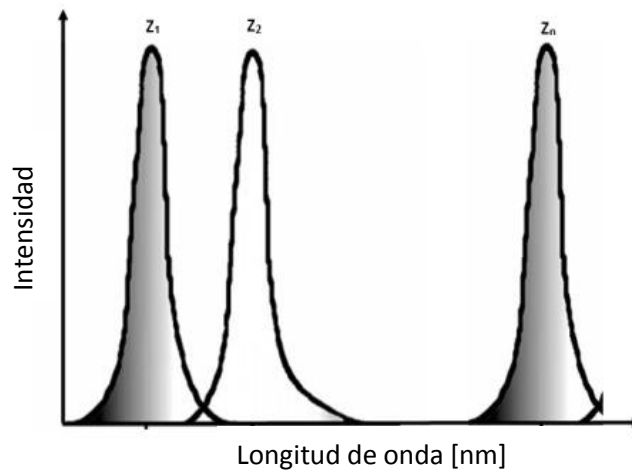


Figura 2.12. Espectro de transmisión que se espera observar en el espectrofotómetro.

Como se puede observar en la figura 2.12, hay presencia de N planos y este efecto se comentó en el filtrado espacial, para el diseño planteado se tiene una fibra que posee dimensiones de $9 \mu\text{m}$, y donde analíticamente se pide un orificio de máximo de $6.4 \mu\text{m}$, por lo tanto la eliminación de otros planos no será la mejor, por ende se plantea la eliminación de información de los planos fuera de foco a través del procesamiento.

Para la formación de la imagen en 3D, se recopilan los datos obtenidos en el anterior proceso, donde cada uno es resultado del escaneo de cierta parte de la muestra, al juntarlos se creará una escala que permite identificar las diferentes secciones de donde se adquirió la información.

Con los dos anteriores análisis se determinó que para el diseño del MCMLFO propuesto en esta tesis, tiene las siguientes características:

- Una fuente láser monocromática en el IR que por estar descalibrada tiene una baja coherencia y emite componentes adicionales en el rango visible (550 nm - 680 nm)
- Un acoplador 2x1 con fibra SMF-28
- Dos lentes biconvexas BK-7 con $R_1=R_2=93 \text{ mm}$ y un foco de 100 mm
- Objetivo de 60x con una $AN=0.85$
- Resolución espacial de $0.4 \mu\text{m}$
- Resolución axial teórica de hasta $24 \mu\text{m}$ de profundidad
- Filtrado espacial de $9 \mu\text{m}$
- Procesamiento para la formación de imágenes en 2D y topográficas en 3D.

En este capítulo se abordó el diseño de las etapas que conforman a un MC, con lo que se demostró que el esquema de multilongitud de onda puede ser utilizado para formar diferentes planos en la profundidad de la muestra. Como principales aportaciones, se tiene la sustitución de la apertura del pinhole por una fibra óptica con un núcleo de $9 \mu\text{m}$, que a su vez tiene un cono de aceptación con un ángulo de 8.04° , el cual se encuentra por encima del ángulo de la lente, permitiendo mayor captación de la luz, dejando el diámetro del haz del sistema óptica en dominios de la fibra. Así mismo, se eliminó el escaneo mecánico en el eje z , se plantea una resolución espacial de $0.4 \mu\text{m}$ y una

resolución axial micrométrica, todo lo anterior permitirá obtener información de las muestras para realizar un procesamiento para la formación de imágenes en 2D y 3D.

Referencias

- [19] B. Saleh, M. Teich, (1991). Fundamentals of Photonics. Estados Unidos. John Wiley & Sons.
- [20] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019). Numerical Aperture and Image Resolution. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/tutorials/imageformation-airyna>
- [21] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019). Aberrations in Confocal Microscopy. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/aberrations-in-confocal-microscopy>.
- [22] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019). Critical Aspects of Confocal Microscopy. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/critical-aspects-of-confocal-microscopy>
- [23] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019). Confocal Reflection Microscopy. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/confocal-reflection-microscopy>
- [24] Edmund Optics (2019). Limitations on Resolution and Contrast: The Airy Disk. Recuperado de: <https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/imaging/limitations-on-resolution-and-contrast-the-airy-disk/>
- [25] Edmund Optics (2019) Diffraction Limit. Recuperado de: <https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/imaging/diffraction-limit/>
- [26] Hecht, Eugene (2000). Óptica. (Tercera ed.) Madrid. Addison Wesley Iberoamericana, 722 pp.
- [27] Botero Arbeláez Marcela, Arbeláez Salazar Osiel, Mendoza Vargas Jairo A. (2007). Método ANOVA utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. Scientia et Technica Año XIII. 533-537.
- [28]. Senar J.C. (1999). La Medición de la Repetibilidad y el Error de Medida. Temas actuales en Etología. 53-64.
- [29] SCHOTT optical glass collection (2013). BK7 [Hoja de datos]. Recuperado de: https://www.schott.com/d/advanced_optics/ac85c64c-60a0-4113-a9df-23ee1be20428/1.14/schott-optical-glass-collection-datasheets-english-may-2019.pdf.
- [30] SCHOTT optical glass collection (2013). SF5 [Hoja de datos]. Recuperado de: https://www.schott.com/d/advanced_optics/ac85c64c-60a0-4113-a9df-23ee1be20428/1.14/schott-optical-glass-collection-datasheets-english-may-2019.pdf.

[31] SCHOTT optical glass collection (2013). SF10 [Hoja de datos]. Recuperado de: https://www.schott.com/d/advanced_optics/ac85c64c-60a0-4113-a9df-23ee1be20428/1.14/schott-optical-glass-collection-datasheets-english-may-2019.pdf.

[32] SCHOTT optical glass collection (2013). SF11 [Hoja de datos]. Recuperado de: https://www.schott.com/d/advanced_optics/ac85c64c-60a0-4113-a9df-23ee1be20428/1.14/schott-optical-glass-collection-datasheets-english-may-2019.pdf.

[33] I. H. Malitson, "Interspecimen Comparison of the Refractive Index of Fused Silica", *Journal of the Optical Society of America* 55(10), 1205–1209(1965).

Capítulo 3. Caracterización del microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica- MCMLFO

El objetivo de este capítulo es presentar el montaje final del MCMLFO del cual se habló a detalle en el capítulo anterior. El proceso de caracterización involucra tres procesos importantes, la resolución axial y escaneo, el filtrado espacial y la formación de los planos focales, los cuales brindaran los parámetros más importantes en el desempeño del microscopio. Se presentará el procedimiento que se siguió para determinar las diferentes longitudes de onda que ayudarán a la adquisición de información de los diferentes planos de la muestra. Finalmente se realizará una comparación entre los resultados obtenidos experimentalmente y analíticamente.

3.1 Montaje experimental

Una vez analizados las etapas y los principios analíticos que conforman al MCMLFO, el siguiente paso fue realizar el montaje experimental el cual está conformado por una fuente de ancho espectral amplio (espectro visible de 550 a 680 nm), un acoplador de fibra óptica 2x1 con fibra óptica SMF-28, dos lentes biconvexas, un objetivo 60x y un motor con movimiento en un solo eje (x), como se muestra en la figura 3.1. Se realizaron diferentes pruebas al diseño, a fin de verificar el comportamiento del sistema y con los datos obtenidos comprobar el principio confocal, en la figura 3.2 se muestra una fotografía del montaje.

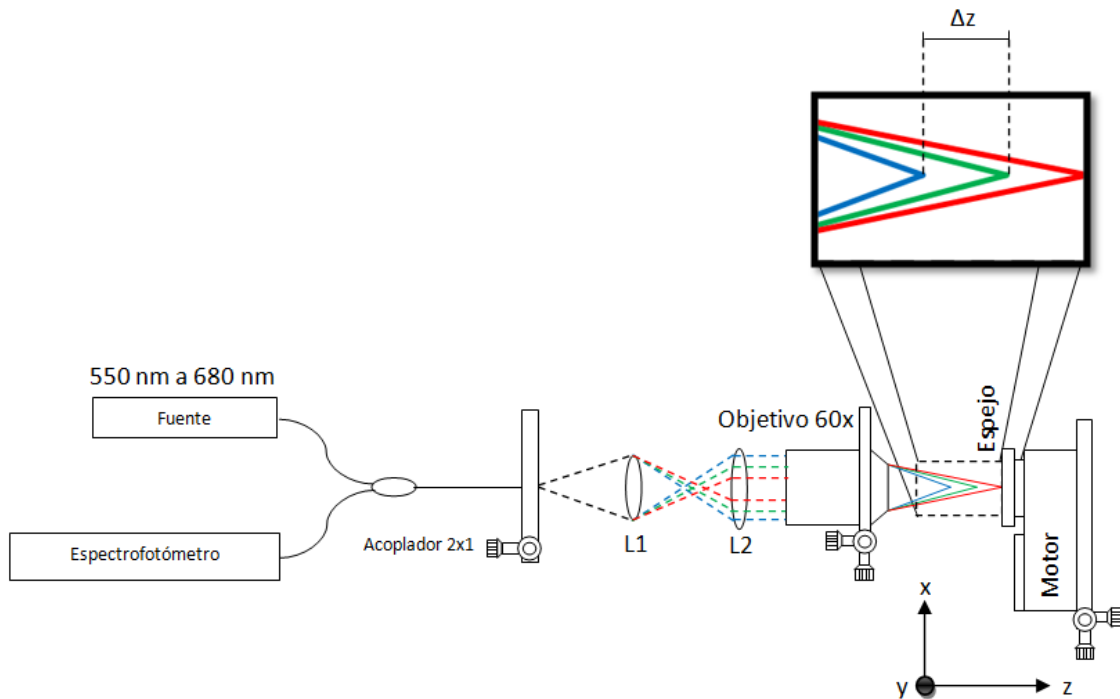


Figura 3.1. Esquema del montaje experimental propuesto para un MCMLFO.

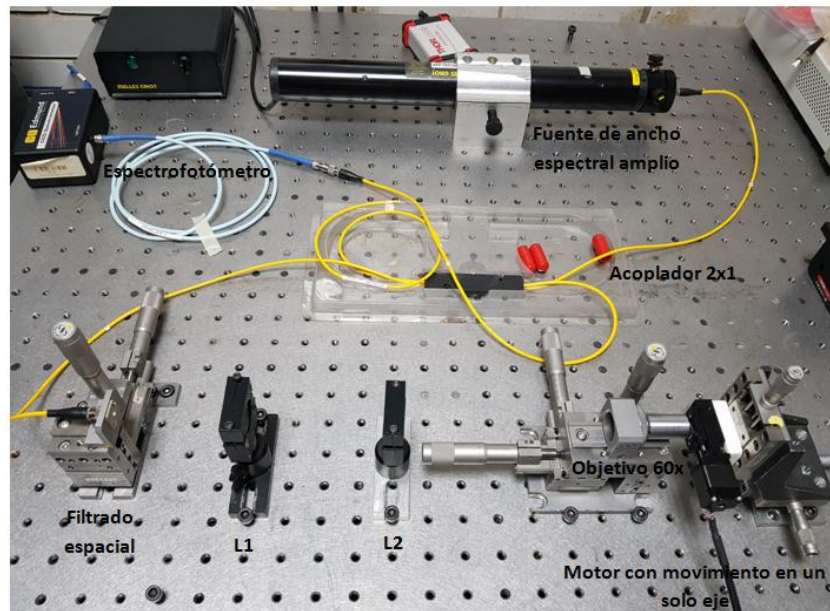


Figura 3.2 Fotografía del montaje experimental del MCMLFO propuesto.

En primera instancia tenemos una fuente de ancho espectral amplio en el rango visible, su espectro de transmisión se muestra en la figura 3.3, es de notar que existe una región donde la fuente tiene una emisión muy constante (aproximadamente entre 580 nm y 640 nm) y se podrían encontrar planos confocales a la misma intensidad, lo que ayudaría al momento de realizar la interpretación y la formación de una topografía 3D de una muestra bajo estudio.

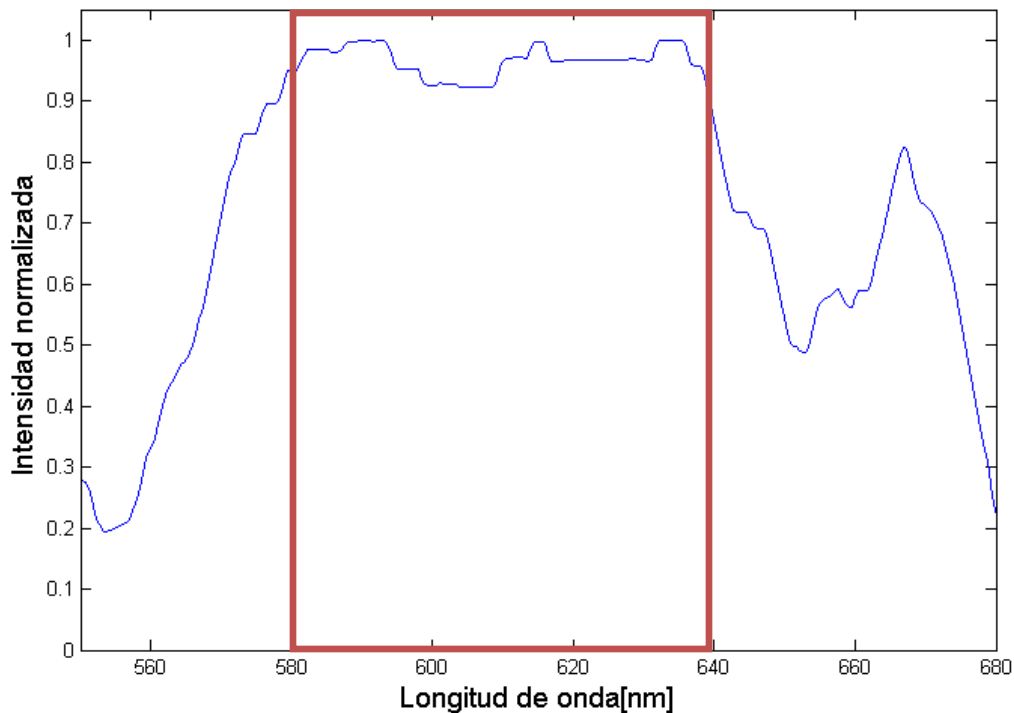


Figura 3.3. Espectro de transmisión de la fuente de ancho espectral amplio. Caracterización en el rango visible que va de $\lambda=550$ nm a $\lambda=680$ nm

Las pruebas realizadas consistieron en utilizar un espejo con un alto porcentaje de reflexión (90%), el cual se iba moviendo en forma axial (eje **z**) para encontrar los diferentes planos focales al máximo de intensidad para una cierta longitud de onda. Posteriormente con ayuda de un elemento reflejante en forma de peine, se le realizará un escaneo en un solo eje con el objetivo de verificar si la resolución espacial obtenida analíticamente cumple con el objetivo de que no exista traslape de información, además de comprobar si el diseño es capaz de escanear una muestra con dimensiones micrométricas.

Asimismo durante la adquisición y calibración de planos focales se hicieron pruebas de repetibilidad y reproducibilidad con el objetivo de entender cuál es su desempeño frente a ciertas condiciones de medición y varios tipos de muestras.

3.1.1 Resolución axial

Para esta medición como se mencionó en los capítulos anteriores, se utilizó como muestra un espejo con un alto porcentaje de reflexión, para hacer la calibración de los planos confocales. Para este estudio se utilizó una fuente monocromática a 660 nm, el cual permitió tener una referencia inicial para realizar un escaneo de planos. Una vez que se ubicó la máxima intensidad en este punto a través de la posición axial del espejo, se procedió a realizar un escaneo en el eje **z**, ahora utilizando una fuente de ancho espectral amplio (Figura 3.3), buscando encontrar la mayor cantidad de planos confocales experimentalmente bien definidos.

La prueba consistió en un barrido en el eje **z** en una distancia total de 60 μm , en donde se obtuvieron 5 planos confocales. En la tabla 3.2 se muestran los planos encontrados y a qué distancia se encuentran ubicados, en la figura 3.5 se observa que los planos se encuentran definidos, con un FWHM angosto y que tienen un comportamiento monocromático.

Tabla 3.2. Planos confocales en la segunda prueba realizada haciendo uso de la fibra óptica como filtro espacial.

Longitud de onda	Distancia experimental
583 nm	0 μm
591 nm	4 μm
599 nm	9 μm
632 nm	18 μm
665 nm	26 μm

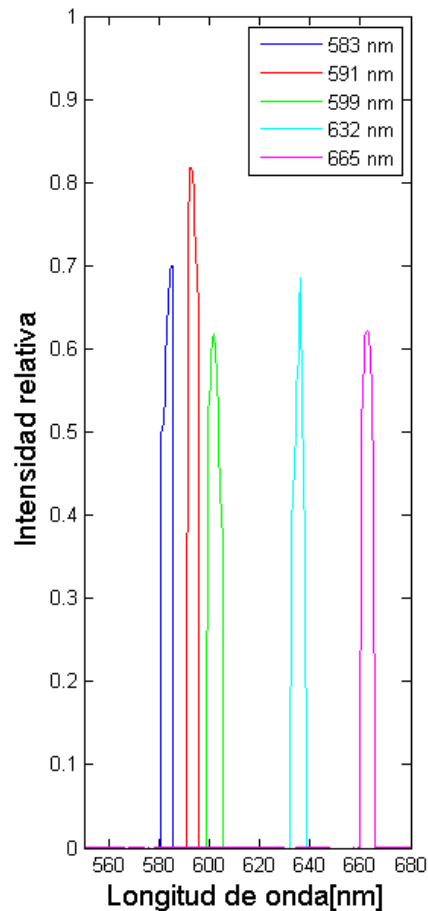


Figura 3.5. Espectro en transmisión para los planos confocales encontrados correspondientes a cinco longitudes de onda.

Hay que hacer hincapié en que se definen pocos planos confocales obtenidos en la prueba, aunque teóricamente existen más planos confocales dentro del rango donde nos encontramos trabajando. Sin embargo, cuando se realizó el estudio del material BK7, una de las características que tiene es que a longitudes de onda más largas la separación entre focos es menor, lo que indica que su localización es compleja y las reflexiones a las longitudes de onda se encontrarán muy pegadas entre sí. Por esta razón sólo se destacan estos planos, porque fueron los únicos que presentaban las características deseadas: FWHM angosto (apariencia monocromática) que permita una buena definición de la longitud de onda, con un valor de intensidad superior a 0.5 y que se encuentren dentro del rango deseado.

Con esta prueba se comprobó el uso de la fibra óptica como filtrado espacial, donde como se predijo hubo la existencia de planos fuera de foco, teniendo como consecuencia que no se definieran correctamente y la existencia de otras longitudes de onda. El siguiente paso es realizar las simulaciones en ZEMAX en el montaje planteado en el capítulo 2, el cual permitió observar el comportamiento de la aberración cromática de las lentes, permitiendo identificar las distancias experimentales a las que se encontraba cada una de las longitudes de onda.

Para que la simulación se acercará a los valores del montaje experimental, se respetaron las distancias entre cada elemento, se trazaron las 5 longitudes de onda encontradas experimentalmente, en la tabla 3.3 se presenta una comparación entre las distancias

encontradas en la simulación y las obtenidas en la calibración de planos confocales, con su respectivo error, además del ancho espectral que posee cada uno de los planos confocales.

Tabla 3.3. Comparación de los planos encontrados experimentalmente y en la simulación de Zemax.

Longitud de onda	Δz_{calc}	Δz_{exp}	Error	FWHM
583 nm	0 μm	0 μm	0%	6 nm
591 nm	3.6 μm	4 μm	11.1%	5 nm
599 nm	7 μm	9 μm	28.5%	6 nm
632 nm	16.2 μm	18 μm	11.1%	7 nm
665 nm	24.5 μm	26 μm	6.1%	4 nm

Analizando la tabla podemos observar que los resultados simulados y los obtenidos experimentalmente, son muy cercanos entre sí. Esta pequeña diferencia considero que se debe a que en una simulación no se encuentra sometido a todas las variables que pueden afectar a un montaje real, como las vibraciones, el polvo, el ruido ambiental, entre otros. Pero si analizamos el porcentaje de error que hay entre las distancia entre planos, 3 de los 5 presentan un alto porcentaje lo que me indica que no se encuentran dentro del rango esperado, por lo tanto entre lo simulado y experimental, se llega a la conclusión de que las distancias entre los planos confocales encontrados son resultados no favorables.

En esta etapa de resolución axial se concluye que para construcción del MCMLFO, el uso de una fibra óptica de 9 μm , funciona muy bien, sin embargo en la etapa de reconstrucción topográfica se espera que los resultados presenten ruido o algunos planos confocales no mencionados en este apartado. Por último, con ayuda de las simulaciones hechas en ZEMAX se pudo conocer la resolución axial tanto teórica como experimental, las cuales se encuentran entre $4 \mu m \leq \Delta z_{exp} \leq 9 \mu m$ y $3.6 \mu m \leq \Delta z_{calc} \leq 8.3 \mu m$, respectivamente, además de que se pudo determinar experimentalmente solo 5 planos confocales bien definidos y con FMWH angosto.

3.1.2 Resolución espacial

Es la primera prueba que se realizó, respetando las etapas que conforman a un MCMLFO, se define como la distancia mínima que debemos recorrer para adquirir la información de un punto, sin que haya traslape de información. Se calculó teóricamente en el anterior capítulo, obteniendo una resolución de 0.4 μm , lo cual asegura que se va obtener información de un punto en específico dentro de la muestra. Indica cual es la distancia con la cual se debe mover el motor a pasos para realizar un correcto escaneo en el plano de imagen (x, y).

Para comprobar lo anterior se propone la adquisición de información de un elemento reflejante con forma de peine con dimensiones de 5 μm (d) como se muestra en la figura 3.6, de un material metálico. Se realizó un barrido lateral en un eje sobre la zona de

escaneo, haciendo uso de una fuente de ancho espectral amplio, movimientos espaciales en $0.5 \mu\text{m}$ y con una distancia de recorrido de $20 \mu\text{m}$.

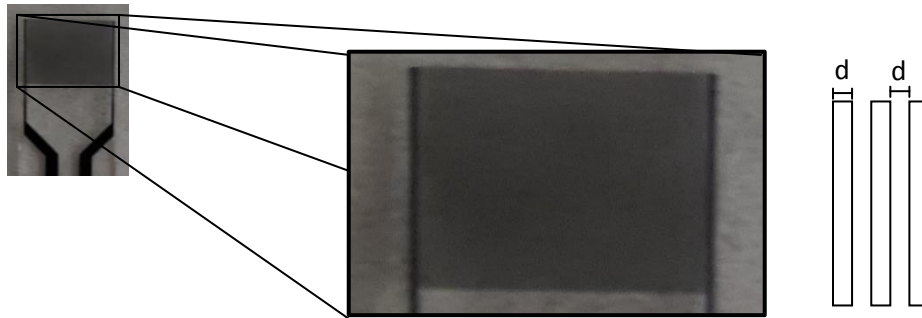


Figura 3.6. Elemento reflejante que en la parte superior tiene dimensiones de $5 \mu\text{m}$ de separación entre cada elemento metálico.

El perfil de escaneo obtenido en esta prueba se puede observar en la figura 3.7, donde se presentan los diferentes elementos reflejantes que componen a esta muestra, en la gráfica se puede observar dos valores de intensidad, los superiores corresponden al plano confocal de 580 nm y los inferiores a 650 nm , el resto de planos confocales no aparecen porque al ser un elemento de metal no hay mayor penetración por encima de la superficie, entregando nula información. En el caso del plano de 650 nm al recorrer mayor distancia hacia el objetivo la intensidad de luz se ve atenuada. Se normalizó con respecto a la intensidad máxima obtenida en el espectro de referencia.

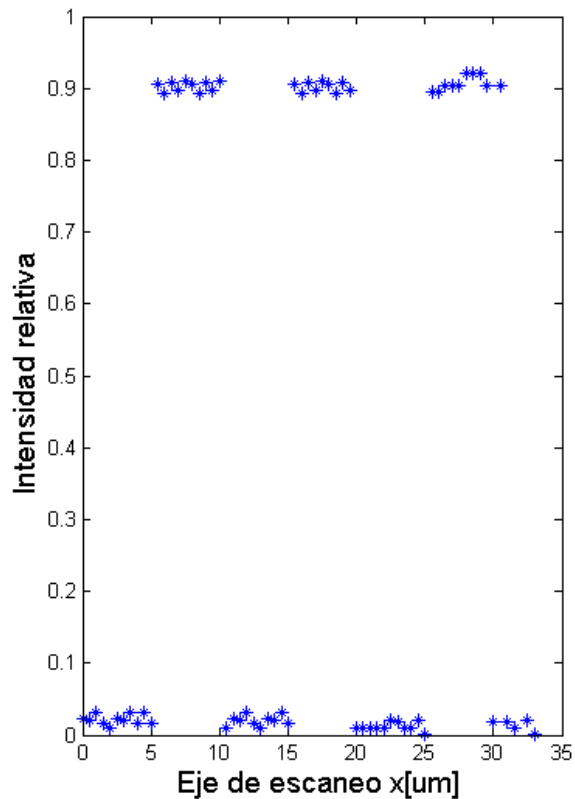


Figura 3.7. Elementos reflejantes escaneados con $0.5 \mu\text{m}$ de resolución espacial.

Con los resultados alcanzados se cumple con el objetivo de tener una resolución espacial en micrómetros, sin embargo, en comparación con los microscopios confocales actuales para la adquisición de información de muestras, en cualquier montaje óptico, se necesitan altas resoluciones. Uno de los mecanismos para optimizarla, es aumentar la apertura numérica del objetivo o utilizar un medio con un índice de refracción mayor, bajo condiciones ideales con los objetivos más poderosos, la resolución se acerca a 25 nanómetros, que al compararnos con estos valores, nuestra resolución es muy baja, pero para nuestros intereses funciona bien.

3.1.3 Filtrado espacial

En el capítulo anterior se mencionó que el principal objetivo de esta etapa es evitar el paso de los planos fuera de foco ya que estos contienen información de otras secciones de la muestra traduciéndose en una mala interpretación. Por ende esta etapa de caracterización está fuertemente ligada a la etapa de caracterización de resolución axial, que será abordado en el siguiente apartado y es aquí donde radica su importancia, debido a que si no se realiza un buen filtrado espacial, no se podrá resolver correctamente las siguientes etapas del MCMLFO. Se retoman los resultados y conceptos abordados en el capítulo anterior, donde al comparar la AN de la fibra óptica y la lente, se tienen valores muy cercanos entre sí, lo que nos indica que la luz proveniente de la lente será captada en su mayoría, evitando pérdidas de luz por reflexión.

Asimismo se realizó el análisis del tamaño del orificio con el cual se filtrarían los planos y si la fibra óptica empleada es un elemento que cumple con dicho objetivo, se obtuvo un diámetro de $6.4 \mu\text{m}$ y se comparadas con las dimensiones del diámetro del núcleo que posee la fibra óptica del acoplador 2x1 ($9 \mu\text{m}$), se deduce que realizará el filtrado sin embargo permitirá el paso de algunos planos fuera de foco, la presencia de varios de ellos en un punto de enfoque o simplemente planos confocales con un FWHM ancho, lo que puede traducirse en que la información obtenida tendrá datos de planos no deseados y que a través del procesamiento se buscará disminuir su efecto en los resultados.

3.2 Caracterización utilizando fuentes láser coherentes

Con toda la información recopilada en la anterior prueba, se decidió construir un montaje con dos tipos de fuentes monocromáticas, una a 475 nm y otra a 660 nm . En este caso se hizo uso de dos acopladores 2x1 con fibra SMF-28 para poder combinar ambas fuentes, y se realizó la misma prueba de resolución axial para conocer a qué distancia focal se encontraba una de otra, en la figura 3.9 se muestra un esquema del montaje propuesto.

Se colocó el espejo de calibración en la posición de la muestra, se realizaron desplazamientos en el eje z . Se encontró que la distancia focal que separa a ambas longitudes de onda es de $100 \mu\text{m}$, en la figura 3.8 se muestran el espectro obtenido en el espectrofotómetro de ambas longitudes de onda combinadas, el cual se encuentra normalizado con respecto a la intensidad máxima obtenida entre ambas longitudes de

onda y por último en la tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos directamente del espectro.

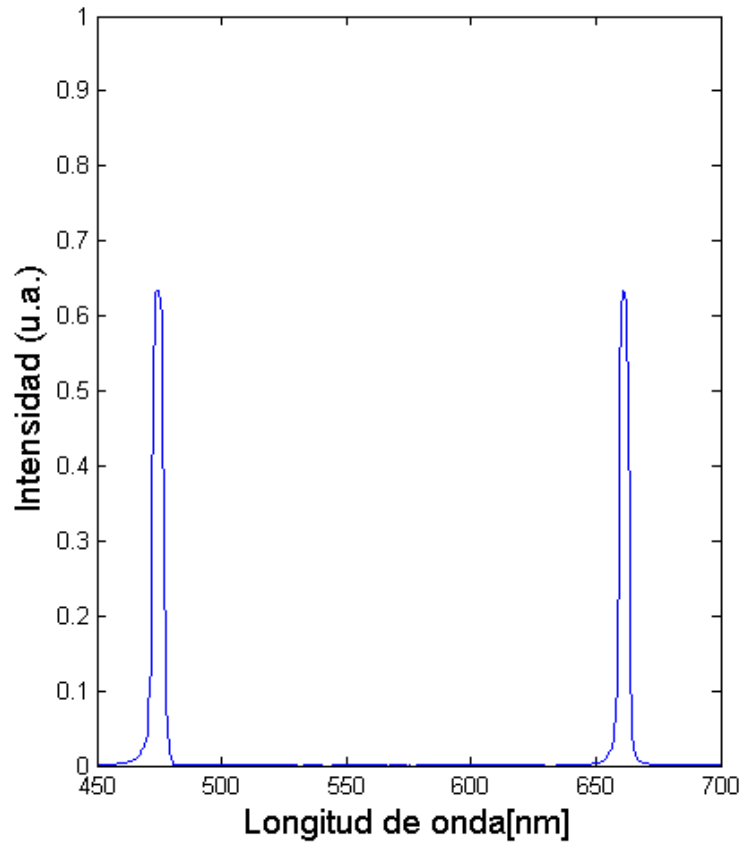


Figura 3.8. Espectro de la combinación de dos fuentes coherentes.

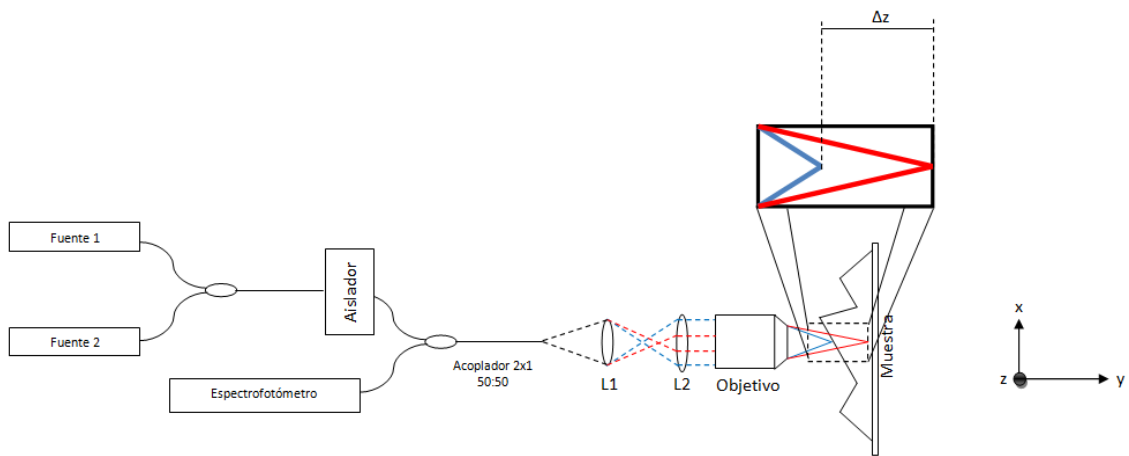


Figura 3.9. Esquemático del montaje propuesto para la respuesta del MC a dos fuentes coherentes de $\lambda=475$ nm y $\lambda=660$ nm.

Tabla 3.4. Datos adquiridos del espectro de la combinación de las dos fuentes coherentes.

Longitud de onda	FWHM
475 nm	15 nm
660 nm	15 nm

Con esta segunda propuesta de montaje experimental, donde se respetaron todas las características del montaje original, se pudo comprobar la existencia de otra alternativa para la formación de planos confocales con base en fuentes monocromáticas y haciendo uso de dos acopladores 2x1, una de las principales limitantes del primer diseño es que el rango de penetración es de 26 μm , por esta razón con el objetivo de ampliar esta resolución axial, con este diseño se logra escanear en profundidad hasta 100 μm , permitiendo escanear el grosor una hoja de papel. Sin embargo su desventaja es la cantidad de planos, es decir, solo se cuenta con 2 planos confocales para analizar el grosor de 100 μm , lo que lo convierte en su principal desventaja, lo ideal será agregar más fuentes que permitan tener mayor cantidad de planos confocales y por ende un escaneo axial con mayor información, beneficiando el estudio de la muestra.

3.3 Repetibilidad y reproducibilidad

En esta etapa se realizarán pruebas de repetibilidad y reproducibilidad de los planos confocales encontrados durante las pruebas de resolución axial, las cuales permitirán interrogar en el eje z una muestra, sin necesidad de hacer uso de un dispositivo mecánico que cumpla con esta función. Estas pruebas fueron realizadas con una fuente de ancho espectral amplio, se realizó un barrido con ayuda de un motor en un solo eje, el cual permitió ir analizando los diferentes planos confocales.

3.3.1 Repetibilidad

La repetibilidad se define como la capacidad de que un usuario realice N número de pruebas con un solo sistema y bajo las mismas condiciones [34-37]. Para nuestro caso se realizaron 10 pruebas con una muestra reflejante. En la tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas. Para interpretar los datos adquiridos, se calculó la media y desviación estándar, en la figura 3.10 se muestra los datos graficados.

Tabla 3.5. Media y desviación estándar para cada longitud de onda.

Longitud de onda [nm]	Media \bar{z}_λ [μm]	Desviación estándar σ [μm]
582	0.3	0.04
591	4.5	0.70
599	9	1.05
632	18.4	1.07
665	26.2	0.78

Se puede observar en los resultados que en las 5 longitudes de onda se encuentran muy cerca de su valor nominal que se relaciona con la distancia axial a la cual se encuentra cada plano confocal. Sin embargo para las longitudes de onda de 599 nm y 632 nm presentan una desviación estándar alta, debido a que ya relaciona distancias axiales de hasta 2 μm , lo que provocaría una interpretación incorrecta de los datos. Con lo mostrado en la figura 3.10, se puede deducir que al escanear una zona donde los focos de las diferentes longitudes de onda se encuentran muy cercanos entre sí, aumenta la probabilidad de que los planos no siempre se encuentren a la misma distancia axial, generando una incertidumbre, provocado por el movimiento del motor o por las vibraciones generadas sobre el montaje.

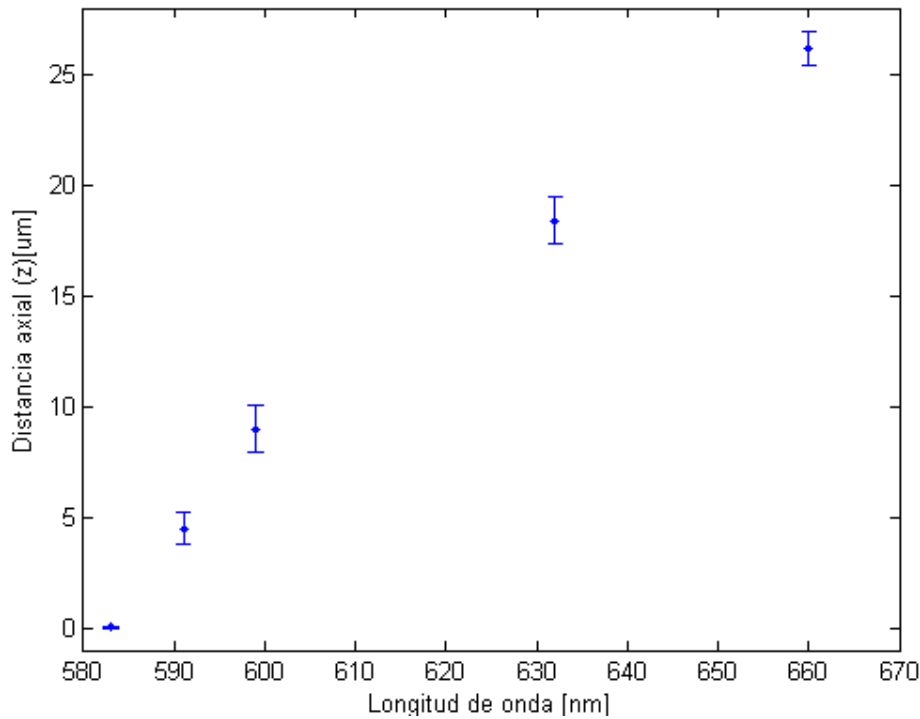


Figura 3.10. Media y desviación estándar para cada plano confocal en repetibilidad.

Asimismo con las medias y desviaciones estándar de cada proceso obtenemos un rango, en el cual podemos identificar qué resultados fueron "normales" o "estándar" y cuales quedaron fuera de estos valores. Para este caso en particular, hay que considerar que los errores se miden a partir de 0 μm . Por esta razón dicha distancia es la que presenta mínima desviación estándar y en los 4 casos restantes del 70% al 90% de los 10 casos presentaron resultados aceptables, lo que me indica que hay un bajo porcentaje de que los planos confocales cambien o se muevan de su distancia axial durante una prueba de escaneo. Puedo concluir que los resultados adquiridos de los planos confocales durante las repeticiones en el escaneo de algún elemento serán confiables.

3.3.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad se define como la capacidad de que varios usuarios realicen N número de pruebas con un solo sistema y bajo las mismas condiciones [34, 35]. En esta

prueba se sometió un elemento reflejante a 10 pruebas realizadas en 10 días distintos. En la tabla 3.6 se muestran los resultados obtenidos de las 10 pruebas realizadas y se volvió a calcular la media y desviación estándar y en la figura 3.11 se muestran los datos graficados.

Tabla 3.6. Media y desviación estándar para cada longitud de onda.

Longitud de onda [nm]	Media \bar{z}_1 [μm]	Desviación estándar σ [μm]
582	0.2	0.04
591	4.3	0.48
599	8.7	0.82
632	18.1	0.56
665	25.9	0.56

La reproducibilidad realizada para las 5 longitudes de onda se tiene entre un 70% a 80% de los pruebas realizadas son resultados aceptables. Sin embargo a diferencia de la anterior prueba aquí disminuye el porcentaje de que la distancia axial cambie o se vea afectada. Es muy interesante este dato porque permite confirmar que cuando se analice una muestra en el día 1 y posteriormente cuando se realice la misma prueba en el día 2, existe la posibilidad de las distancias axiales entre puntos confocales no se vea alterada o modificada, lo que me indica que los resultados no cambiarían de una prueba a otra, sin embargo, el montaje no se encuentra exento de los diversos factores que en cualquier momento y a cualquier hora afecten el diseño, modificando las variables ya antes analizadas, perjudicando las mediciones posteriores a dicha situación.

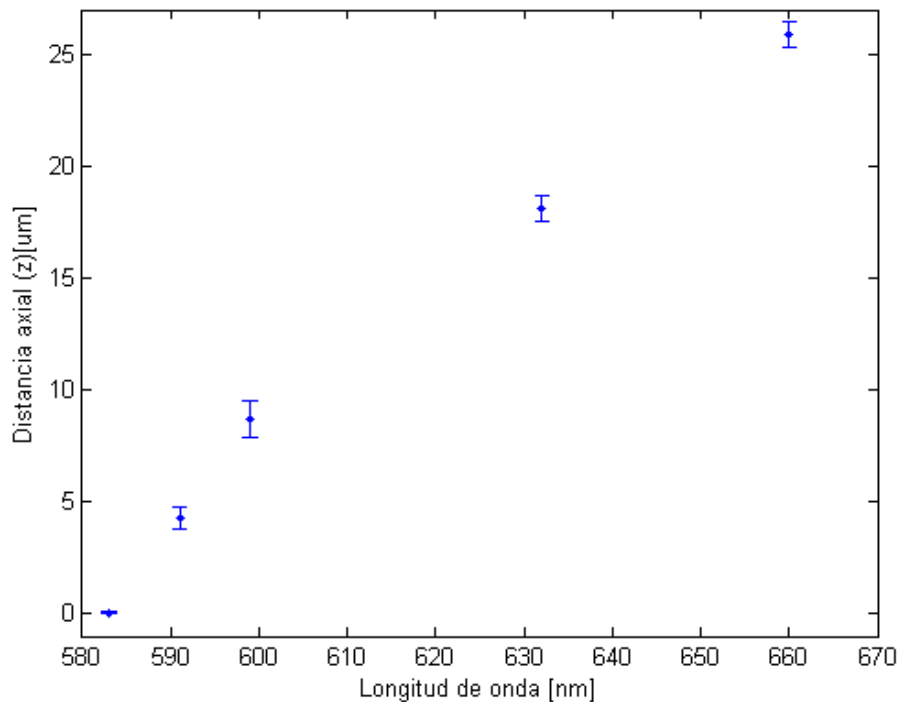


Figura 3.11. Media y desviación estándar de los planos confocales en reproducibilidad

Con esta prueba de reproducibilidad se permite llegar a la conclusión de que el diseño propuesto en este tema de tesis posee muy buena reproducibilidad pero no tan buena repetibilidad, lo que indica que al montaje hay que realizarle algunas modificaciones al diseño para que no se ve perjudicado por situaciones externas a él, por ejemplo, hacerlo más compacto, cambiar algunos elementos, entre otros.

3.4 Reconstrucción topográfica 3D

Como último elemento a tratar dentro del montaje del MCMLFO se encuentra la reconstrucción topográfica en 3D, como se mencionó en el capítulo 2, para poder realizar la construcción de las muestras, solo nos basaremos en la intensidad de reflexión que recibe el espectrofotómetro, para después ser graficada y analizada por el algoritmo que se implementó.

Para analizar la muestra, primero es colocada en la zona de escaneo, para después situar el spot sobre el elemento, el cual corresponde a la longitud de onda más baja, es decir, el primer plano confocal que se obtuvo durante el escaneo axial que tiene una $\lambda=583$ nm, posteriormente se determinaba el área de escaneo, para finalmente realizar un barrido que cubra dicha zona de interés. En el espectrofotómetro se podían observar los resultados que hacen referencia a la intensidad en reflexión de la muestra bajo estudio, se realizaron por cada barrido 10 repeticiones para promediar y disminuir el ruido en la reconstrucción de imágenes. En la figura 3.12 se muestra el espectro que se obtuvo durante la prueba de un elemento reflejante.

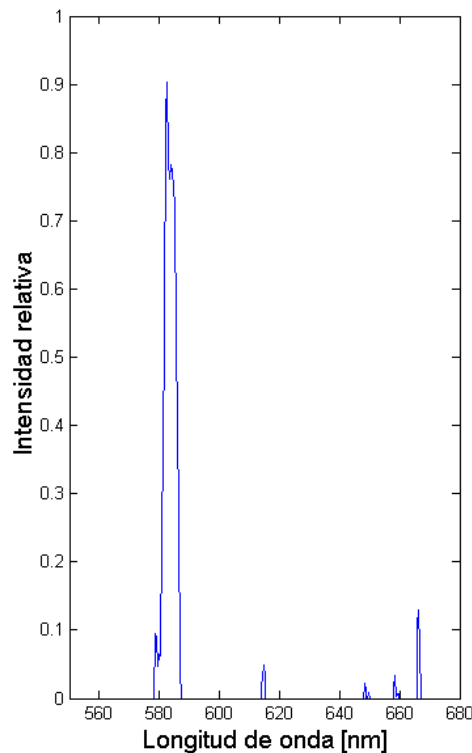


Figura 3.12. Espectros de reflexión de un elemento reflejante.

En ella se puede observar que el elemento analizado es algún material metálico debido a que la muestra no permitió que penetraran más planos confocales posteriores al inicial. En la figura 3.13, se muestra el espectro de las fuentes combinadas cuando se colocó una muestra que presenta mayor dispersión y absorción en su composición, presenta una atenuación en el segundo plano confocal que corresponde a la longitud de onda de 660 nm y confirma que al penetrar a la muestra, las longitudes de onda pierden intensidad al regreso debido a las características que presentan dichos elementos.

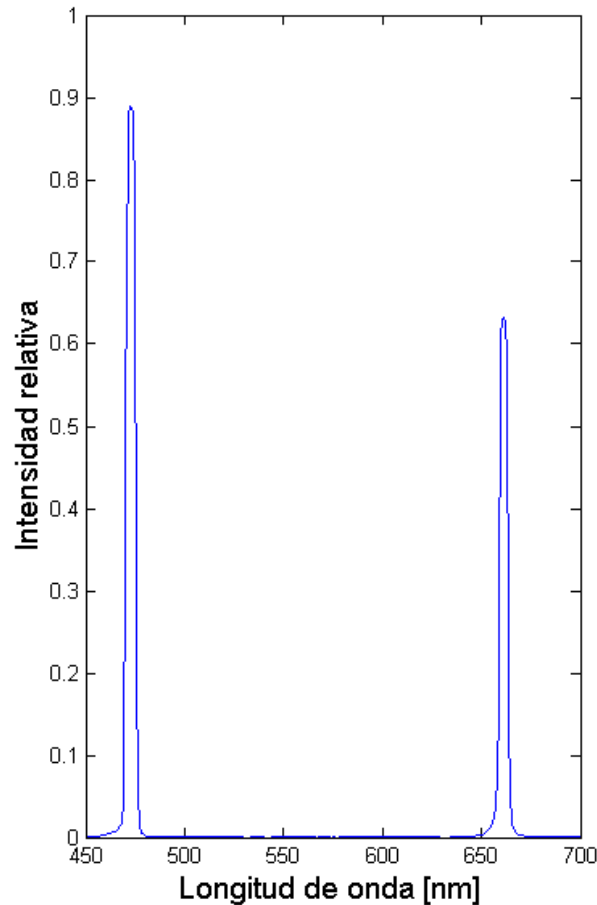


Figura 3.13. Espectro de las fuentes combinadas cuando se realizó el escaneo de una muestra con absorción y esparcimiento.

Una vez adquirido la información, los espectros eran analizados por el algoritmo de detección de máximos, el cual encuentra las intensidades máximas entre las longitudes de onda de interés, posteriormente determina cuál de todos los máximos analizados es el que presenta el mayor valor y por ende será el graficado en la reconstrucción. Por lo tanto al final se tiene una gráfica que solo posee los valores máximos encontrados durante todo el escaneo, sin tomar en cuenta las longitudes de onda atenuadas, permitiendo realizar una reproducción de la superficie de la muestra.

Analizando los resultados obtenidos en este apartado del MCMLFO, el cálculo del filtrado espacial fue correcto, lo podemos comprobar ya que si analizamos detalladamente los

espectros, se puede observar que algunos planos que no fueron estudiados durante la resolución axial aparecen y entran como ruido, generando la sensación de que ahí están y que no fueron filtrados por la fibra óptica, al pasar por el algoritmo de detección de máximos, ya no son tomados en cuenta, pero se debe destacar que hay la presencia de más planos confocales.

Asimismo permitió cumplir con uno de los objetivos más importantes propuestos en este trabajo, la eliminación de un elemento como el pinhole en el de filtrado espacial y la eliminación del escaneo mecánico en z (axial), siendo sustituido por el principio de aberración cromática y donde cada foco de las diferentes longitudes de onda interroga un punto en particular de la muestra en profundidad.

Referencias

[34]. C. Montgomery, Douglas. (2006). Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. (Segunda ed.). México. McGraw-Hill.

[35]. Devore L, Jay. (2010). Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. (Octava ed.). México. Cengage Learning.

[36] Botero Arbeláez Marcela, Arbeláez Salazar Osiel, Mendoza Vargas Jairo A. (2007). Método ANOVA utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. Scientia et Technica Año XIII. 533-537.

[37]. Senar J.C. (1999). La Medición de la Repetibilidad y el Error de Medida. Temas actuales en Etología. 53-64.

Capítulo 4. Resultados experimentales

En este capítulo se presentan los resultados experimentales obtenidos mediante el MCMLFO. Se realizarán reconstrucciones topográficas en 3D de diferentes tipos de materiales donde cada uno posee diferentes características, permitiendo comprobar la hipótesis planteada al inicio de esta tesis. Asimismo se mostrarán comparaciones de las muestras analizadas con un microscopio confocal comercial, permitiendo verificar las dimensiones obtenidas y el desempeño del dispositivo propuesto en esta tesis.

4.1 Reconstrucción de topografía 3D

Con la caracterización realizada en el capítulo anterior, donde se obtuvieron 5 planos focales, ahora con ayuda de un motor con movimiento en un solo eje (**x**) y una platina con movimiento micrométrico, se montaron los ejes **y** y **z**, permitiendo el escaneo en dos ejes de un elemento reflejante y muestras biológicas. Se realizaron pruebas de repetibilidad y reproducibilidad en el elemento reflejante, su perfil y su reconstrucción topográfica en 3D. En los 3 elementos a analizar se realizará una comparación con un microscopio confocal comercial, que permitirá comprobar si las dimensiones adquiridas por el dispositivo implementado son correctas y si se tiene un buen desempeño.

Para la prueba de escaneo en el elemento reflejante consistió en adquirir información en el eje **x** (8 mm) y en el eje **y** (100 μm), con los valores obtenidos se aplicó el algoritmo que selecciona la longitud de onda que predomina, es decir, la que presenta mayor intensidad en el espectro de reflexión de la muestra como se mencionó en el capítulo 3, con esta base de datos se crea un perfil de la muestra y posteriormente una reconstrucción topográfica en 3D de dicho elemento.

Asimismo se mostrarán algunos espectros de reflexión obtenidos en cada muestra, permitiendo comprender que sucede al momento que se captura la luz de reflexión en el espectrofotómetro y que permite la adquisición de información puntual de los diferentes planos que compone a la muestra.

4.1.1 Microscopía de un elemento reflejante

El elemento reflejante, es una muestra que se encuentra conformado por metal y vidrio, que tiene como finalidad formar un electrodo, posee diferentes dimensiones, además de que su composición permite que se recupere mayor cantidad de luz, por las propiedades que tienen los materiales, como se muestra en la figura 4.1.

Utilizando los algoritmos explicados en el capítulo 2 de esta tesis, se escaneo el elemento reflejante en el eje **x**, recorriendo una distancia de 8 mm, posteriormente se desplazó 20 μm en el eje **y** y repetir este proceso sucesivamente, en total se obtuvieron 8 mediciones con 10 repeticiones cada una.

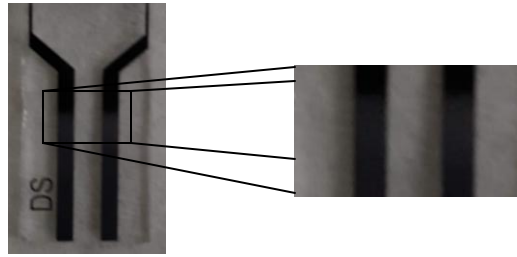


Figura 4.1. Elemento reflejante.

En la figura 4.2 se puede observar el perfil obtenido del elemento reflejante, donde solo se observan los máximos de las longitudes de onda que se encontraron durante el análisis de muestras.

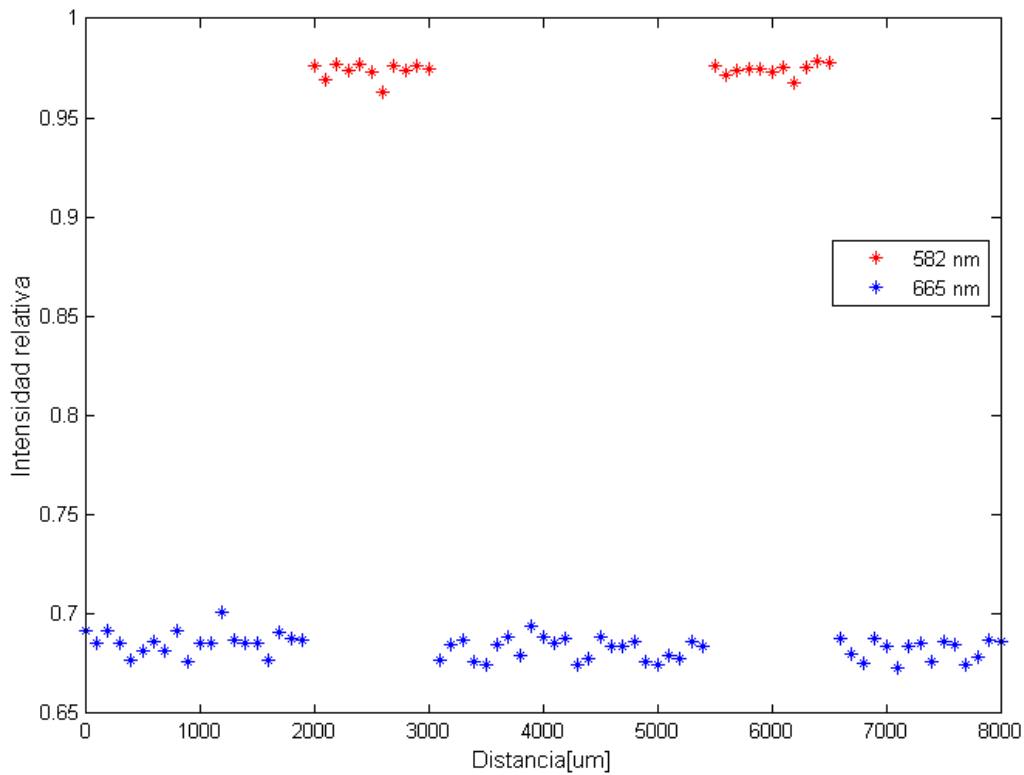


Figura 4.2. Perfil del elemento reflejante.

Como se puede observar, no aparecen todos los planos confocales, es interesante la información que proporciona esta gráfica ya que nos indica que el grosor de los electrodos debe ser aproximadamente de 26 μm , este dato se podrá verificar cuando realicemos la comparación con el microscopio confocal comercial. En la figura 4.3, se muestra el espectro obtenido durante el escaneo de la muestra.

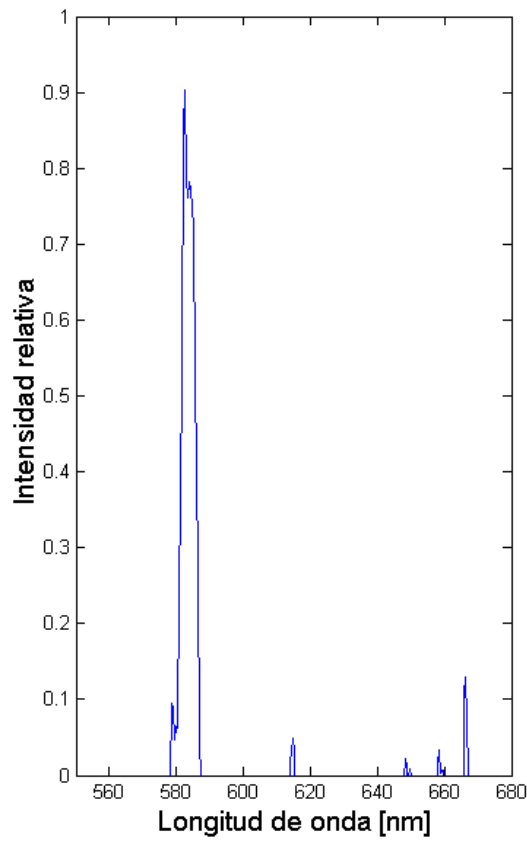


Figura 4.3. Espectro de reflexión de la zona entre el extremo del electrodo del elemento reflejante.

En la figura 4.4 se muestra la reconstrucción en 3D del elemento bajo estudio, se puede observar que a lo largo del escaneo presenta cambios en intensidad y consideró que se debe a que durante la medición algunas vibraciones provocadas principalmente por el movimiento del motor afectaron la medición o simplemente el dispositivo fue capaz de detectar que dicha muestra no es uniforme y presenta rayones o alguna otra alteración en su superficie.

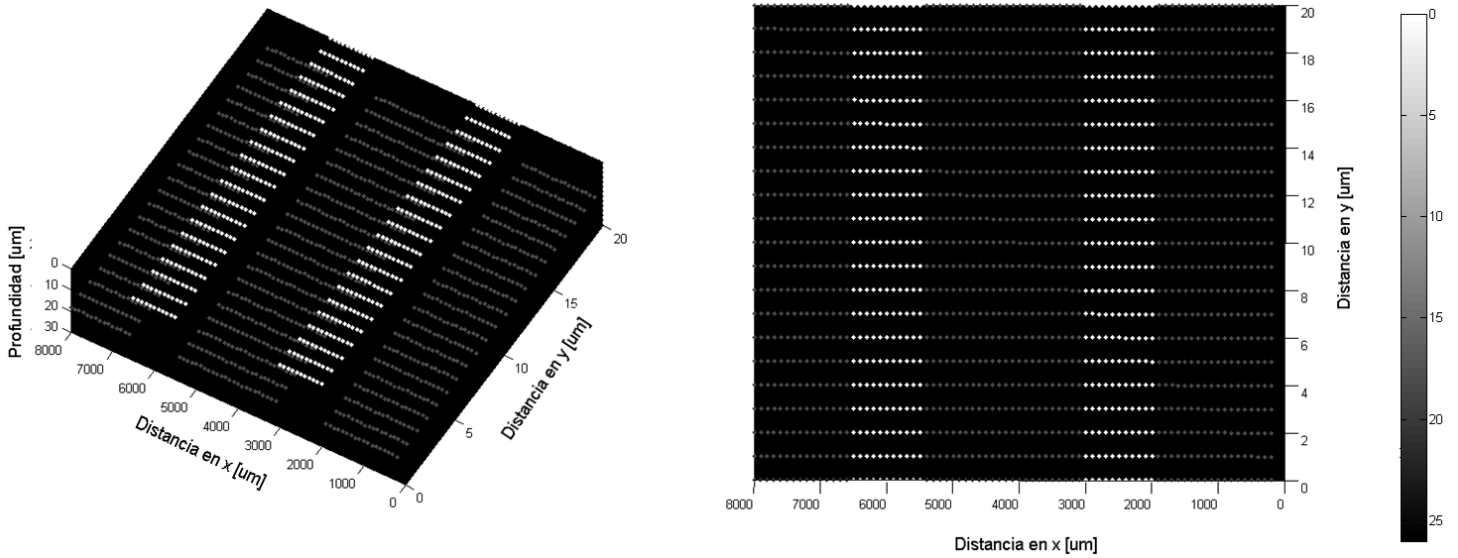


Figura 4.4. Reconstrucción topográfica 3D del elemento reflejante.

A continuación se muestran la repetibilidad y reproducibilidad de este elemento reflejante, donde se busca conocer como es el funcionamiento del sistema propuesto, permitiendo ser comparado con un microscopio confocal comercial.

4.1.1.1 Repetibilidad

En el capítulo 3 se realizó esta misma prueba sobre los planos focales y dicho ensayo consiste en realizar N pruebas a un sistema por una persona y bajo las mismas condiciones. Para este caso se realizó 10 pruebas sobre el elemento reflejante y donde se busca comparar las dimensiones de la muestra con las obtenidas en otro MC.

En la tabla 4.1 se puede observar los resultados de las 10 pruebas realizadas y cuáles son las dimensiones obtenidas en cada una de ellas en la zona de los electrodos gruesos, para después interpretar dichos datos a través de la media y desviación estándar.

Tabla 4.1 Repetibilidad del elemento reflejante

Número de prueba	Dimensiones de los electrodos gruesos
1	1.05 mm
2	1.09 mm
3	1.10 mm
4	1.00 mm
5	0.99 mm
6	1.02 mm
7	1.00 mm
8	0.98 mm
9	1.05 mm
10	1.01 mm

$$\bar{d} = 1.02 \text{ mm}$$

$$\sigma = 0.04 \text{ mm}$$

Con los datos obtenidos, permite concluir que las dimensiones del electrodo grueso son de aproximadamente 1 mm. En las pruebas realizadas se obtuvieron que el 80% de los casos analizados caen en el rango de lo "estándar", siendo un valor elevado comparado con el 20% que queda fuera de dicho rango, permitiendo asegurar que las dimensiones obtenidas por el sistema siempre se acercaran al valor real presentando con poca incertidumbre a la hora de analizar las dimensiones de cualquier muestra. Para el caso de los electrodos delgados presentados en el capítulo 3, ya no se decidió agregarlos a estas pruebas debido a que no presentó un cambio destacable en la incertidumbre durante las 10 pruebas realizadas, porque en todo momento permitió medir las dimensiones de estos elementos sin ningún problema, lo que permite concluir que el sistema propuesto puede medir dimensiones menores a 5 μm .

4.1.1.2 Reproducibilidad.

Para este caso se realizaron 10 pruebas, cada una en diferente día, se volvieron analizar los electrodos gruesos del elemento reflejante. En la tabla 4.2 se muestran los resultados obtenidos para los electrodos gruesos, con su respectiva media y desviación estándar.

Tabla 4.2. Reproducibilidad de las dimensiones del elemento reflejante

Número de prueba	Dimensiones de los electrodos gruesos
1	1.04 mm
2	1.00 mm
3	1.08 mm
4	1.00 mm
5	1.00 mm
6	1.00 mm
7	1.01 mm
8	1.00 mm
9	1.03 mm
10	1.05 mm

$$\bar{d} = 1.02 \text{ mm}$$

$$\sigma = 0.02 \text{ mm}$$

Para este caso, la reproducibilidad presentó la misma tendencia que la repetibilidad, donde el 80% de los casos entran en el rango de información aceptable, con respecto al 20% que quedó fuera. Además nos volvió a proporcionar un valor aún más cercano a un 1 mm, lo que nos indica que la información adquirida por nuestro sistema es confiable, además de que la incertidumbre disminuyó lo que ayuda al analizador a confiar en los datos proporcionados por el sistema. Al igual que en el caso anterior los electrodos delgados se les aplicó la prueba, siendo satisfactorias, en todas las pruebas se obtuvo las dimensiones correctas de estos elementos, presentando baja incertidumbre y confirmando las conclusiones alcanzadas en la anterior prueba.

4.1.2 Comparación con el microscopio confocal comercial.

El microscopio confocal comercial que se utilizó para analizar el electrodo y que permitió realizar una comparación con los resultados obtenidos, es un Nikon A1R+ STORM [38] que se muestra en la figura 4.7, el cual se encuentra en el Instituto de Biomédicas de la UNAM, para poder efectuar dicho análisis, lo que primero que se realizó es una configuración en el microscopio confocal Nikon que tuviera los parámetros que se utilizaron en el diseño del MCMLFO.



Figura 4.7. Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM [38].

La configuración que se obtuvo es la siguiente: un filtrado espacial $10\ \mu\text{m}$ (fue el valor más cercano a las dimensiones de la fibra), se trabajó en longitudes de onda de $550\ \text{nm}$ a $700\ \text{nm}$, con un objetivo de $60\times$ y se realizó un escaneo punto por punto como se efectuó en este trabajo.

La imagen en 2D que se obtuvo del microscopio confocal se muestra en la figura 4.8, en donde se puede observar los electrodos gruesos, en donde se obtuvo una dimensión de $1\ \text{mm}$. En la figura 4.9 se puede observar que la muestra presenta algunos rayones e imperfecciones que confirma que el sistema propuesto alcanzó a detectar.

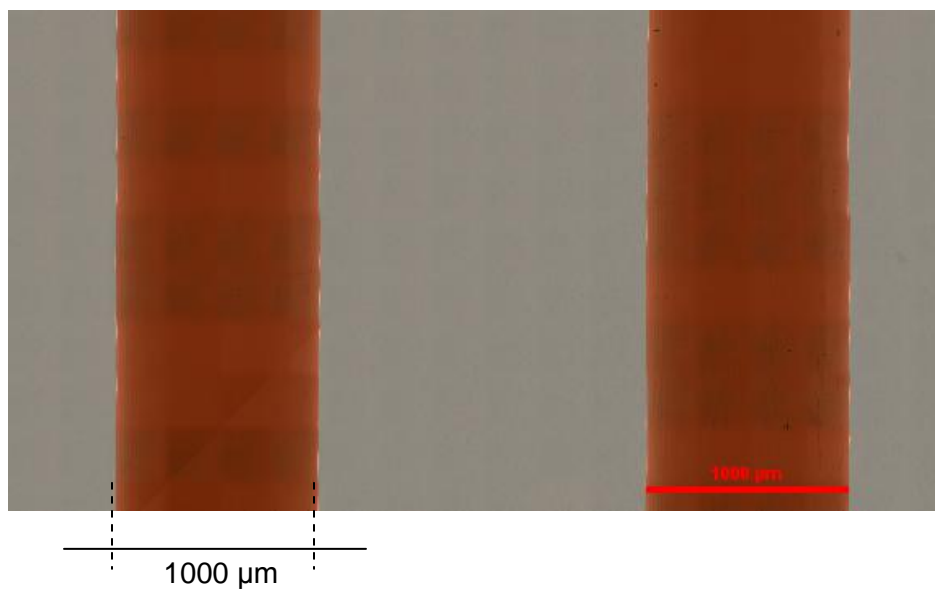


Figura 4.8. Imagen 2D del elemento reflejante con el microscopio confocal Nikon.

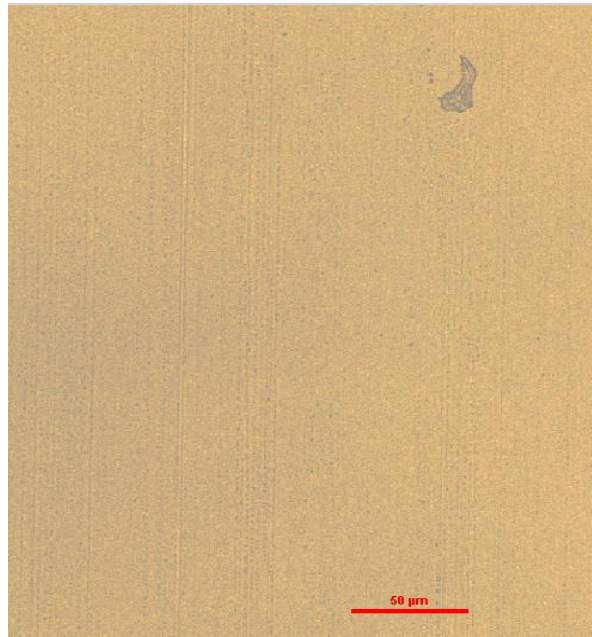
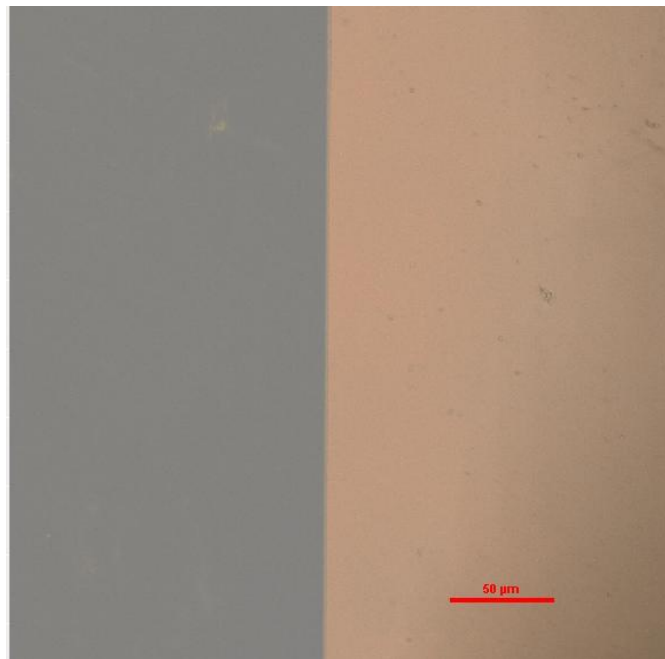
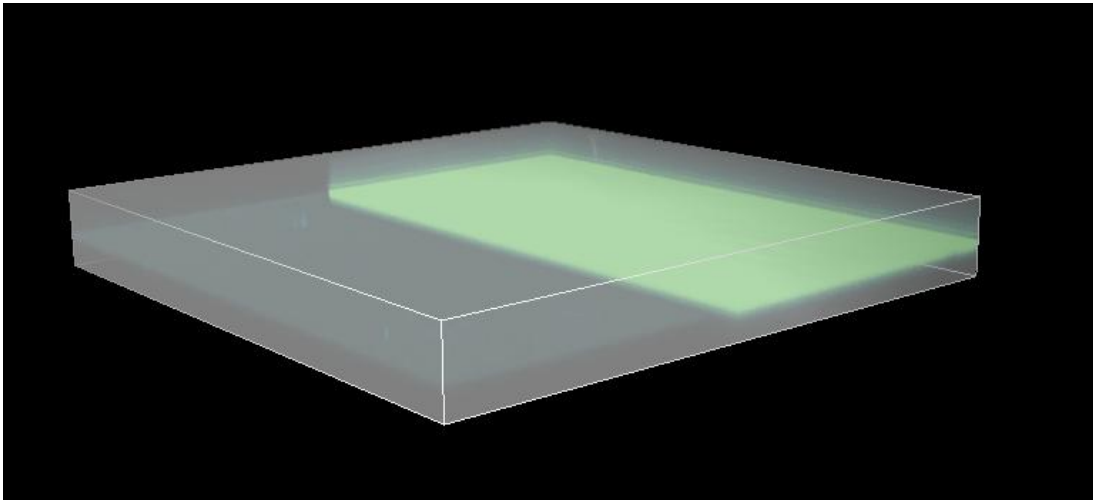


Figura 4.9. Imperfecciones encontradas en el elemento reflejante durante el escaneo.

En la figura 4.10 se muestra una parte del electrodo, corresponde a su imagen en 3D reconstruido por Nikon View, con esta imagen se puede definir el grosor del material con que se encuentra conformado los electrodos y que de acuerdo al microscopio confocal Nikon es de $30\ \mu\text{m}$, que al ser comparado con el resultado obtenido en el anterior apartado, confirma que a $26\ \mu\text{m}$ todavía existen planos por debajo de este valor que podían ser escaneados.



a)



b)

Escalas - Ancho: 316 μm / Largo: 316 μm / Profundidad: 32 μm

Figura 4.10. Zona de escaneo del elemento reflejante: a) Imagen 2D b) Imagen 3D.

Con los datos obtenidos se puede concluir que las dimensiones obtenidas durante el escaneo de la muestra con el MCMLFO fueron correctas y que la repetibilidad y reproducibilidad indicaban esta tendencia, sin embargo en el grosor del material el sistema propuesto nos confirma que su valor no estaba tan alejado de 26 μm ya que el filtrado espacial todavía recibía un porcentaje de señal de la muestra, representado un error del 13%, pero permitiendo concluir que este diseño necesita el aumento de planos focales o un cambio en el rango espectral que permita analizar muestras de mayor grosor, ya que en el presente caso al tener un rango axial tan limitado se convirtió en una limitante del MCMLFO en comparación con un microscopio confocal comercial.

4.1.2.1 Microscopía de muestras biológicas

Como última prueba al MCMLFO propuesto en este trabajo, se plantea colocar una muestra que no sea uniforme ni presente dentro sus propiedades el poder reflejar la luz en un gran porcentaje, además de que presenten problemas al momento de ser analizarlas, las muestras biológicas son las que cumplen con los requerimientos, por lo tanto se propone una hoja de pino y un mosquito, de los cuales se obtendrá su perfil y su imagen en 3D, para después ser comparada con un MC comercial que permitirá analizar si los datos adquiridos por el dispositivo son buenos resultados.

La primera prueba en realizarse fue la hoja de pino, solo se escaneo una sección de la muestra biológica debido a las dimensiones que posee, el principal objetivo de analizarla es verificar si el dispositivo es capaz de detectar alteraciones o fronteras en la superficie, posteriormente se escaneo una parte de la cabeza de mosquito, buscando obtener información de cada uno de los planos focales calibrados para después ser procesado y comparado con el MC comercial. El procedimiento que se realizó y los resultados se muestran en la siguiente sección.

Hoja de pino. En la figura 4.14 se muestra la hoja de pino que fue analizada para la prueba en 2D y 3D, para el primer caso, se realizó un escaneo de 150 μm en el eje x y se recorrieron 20 μm en el eje y, se realizaron 7 mediciones con sus respectivas 10 repeticiones. En la figura 4.15 y 4.16 se muestran el perfil obtenido y la imagen en 3D de la hoja de pino, respectivamente.

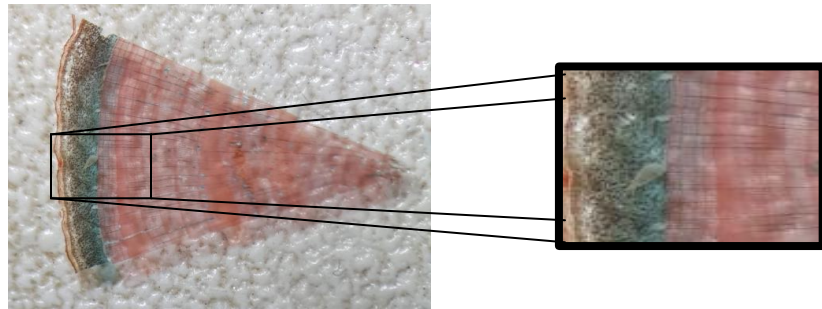


Figura 4.14. Muestra orgánica - Hoja de pino

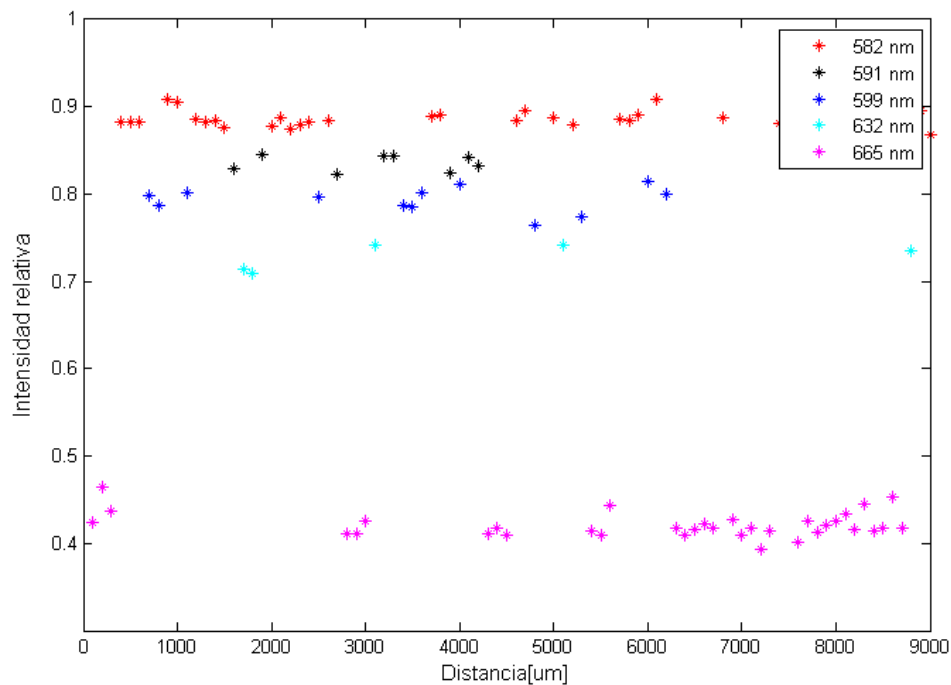


Figura 4.15. Intensidades en cada plano de la hoja de pino

Como se puede observar en la anterior imagen ninguno de los planos confocales calibrados en el dispositivo se perdieron, indicando que en este tipo de muestra se puede interrogar en los diferentes planos que la conforman debido a su composición. Asimismo se puede observar que algunos puntos en los planos no son graficados debido a la absorción que tiene la muestra. Uno de los principales problemas que se presentó durante esta prueba fue que los planos confocales correspondientes a las longitudes de onda de 591 nm y 599 nm al encontrarse muy cercanas entre sí generaron dificultades al momento

de determinar en cuál de las dos se encontraban el máximo de la señal. Esto se comprueba al ver en la imagen que los valores de intensidad entre ambos planos confocales son muy cercanos entre sí

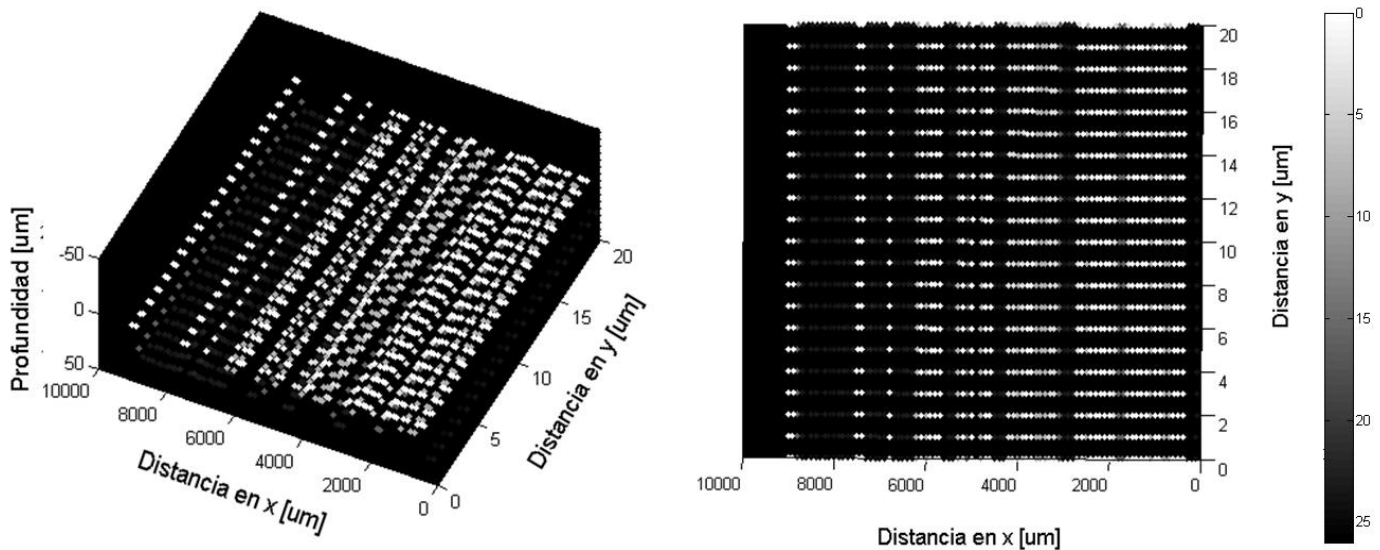


Figura 4.16. Reconstrucción topográfica de la hoja de pino

En la imagen 3D se puede observar algunas divisiones o cambios, que me permite percibir que la muestra presenta cambios en su estructura, además de que no es uniforme, dichas alteraciones las podemos observar en la figura 4.17. Se puede afirmar que el dispositivo MCMLFO detecta estos cambios, pero se debe principalmente porque hubo un cambio en la superficie de la hoja, provocada por su no uniformidad.

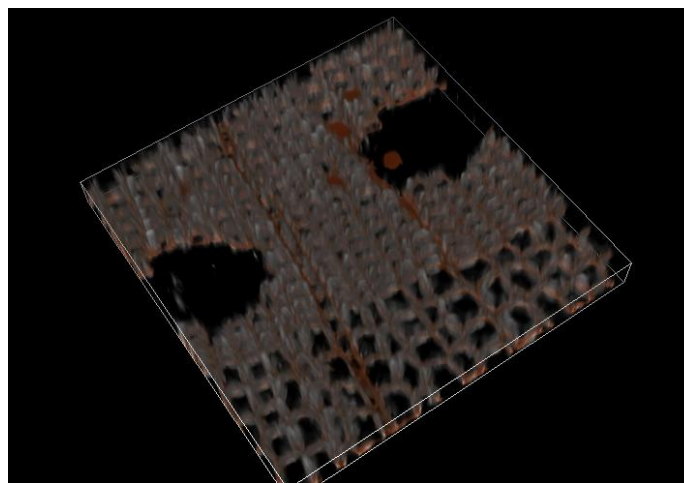
Cuando fue analizada en el microscopio confocal Nikon, donde se emplearon los mismos parámetros de análisis del elemento reflejante, el sistema me confirmó que la muestra no era uniforme. Lo que provocó que el escaneo no fuera sencillo, es decir, el microscopio confocal comercial al analizar la muestra, durante la adquisición de información de un plano y al efectuar el movimiento para adquirir la siguiente zona se desenfocaba, es decir, era ya otro plano, mandando inmediatamente un error, impidiendo continuar con el escaneo. En varias zonas de la muestra se presentaba el mismo caso, lo que provocó que el escaneo se hiciera manual, donde el usuario antes de iniciar la adquisición de la información tenía que enfocar el plano de la zona de interés para después el equipo realizará el análisis, generando que este experimento en lugar de llevarse unos minutos terminará llevando horas en su adquisición. En la figura 4.17 se muestra la imagen 2D de la hoja de pino y donde podemos percibir sensaciones de rugosidad en la muestra.



Figura 4.17. Imagen 2D de la hoja de pino adquirida con el microscopio confocal Nikon.

Al compararlo con los resultados del MCMLFO se puede confirmar que el sistema presentado en este trabajo, si es capaz de detectar cambios en la superficie, por ejemplo la no uniformidad de la hoja de pino, además de que se puede realizar un escaneo de la muestra sin necesidad de realizar un enfoque manual, como sucedió en el comercial, siendo una ventaja sobre dicho dispositivo.

En la figura 4.18 se muestra una imagen 3D de la hoja de pino donde se tiene un grosor 60 μm , además se puede observar la composición física de dicho elemento.



Escalas - Ancho: 316 μm / Largo: 316 μm / Profundidad: 60 μm

Figura 4.18. Imagen 3D de la hoja de pino adquirida del microscopio confocal Nikon

Este análisis representó un reto importante para el MCMLFO debido a que toda la configuración y calibración de este dispositivo se realizó con un elemento que presentaba un alto porcentaje de reflexión. Es de destacar que realizar el análisis en muestras biológicas resulta difícil que se puedan obtener imágenes tan nítidas y con la misma sensibilidad como en las de calibración. Sin embargo con los resultados obtenidos se pudo observar que la hoja presentaba rugosidad, que era un elemento no uniforme y que el sistema logro detectar sin ningún problema. Además de que a la hora de compararlo con el microscopio Nikon en ese aspecto, presentó una ventaja ya que en ningún momento se tuvo que realizar un enfoque manual como en el caso del comercial. Puedo concluir con esta prueba que el MCMLFO tiene la ventaja de interrogar diferentes planos en un punto sin necesidad de enfocar y detectar estos cambios en la superficie, pero no es capaz de detectarlo a detalle como sucede en el caso del microscopio confocal Nikon. Lo que me permite decir que falta mayor procesamiento de imagen en este diseño y confirmando la falta de planos focales.

Mosco. En la figura 4.19 se muestra un mosco, el cual será el elemento de estudio en este segundo análisis, para ello se realizó el mismo proceso que en la anterior muestra, el escaneo del de mosco tanto en el eje x como en el eje y fue de 1 mm, se realizaron 7 mediciones con sus 10 repeticiones. En la figura 4.20 y 4.21 se puede observar el perfil y la imagen 3D del mosco obtenido, respectivamente.

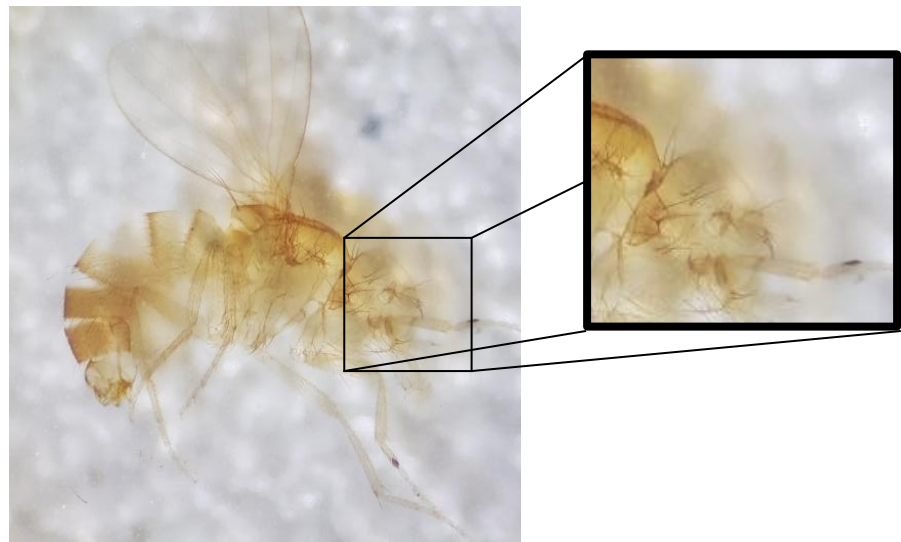


Figura 4.19. Muestra orgánica - Mosco.

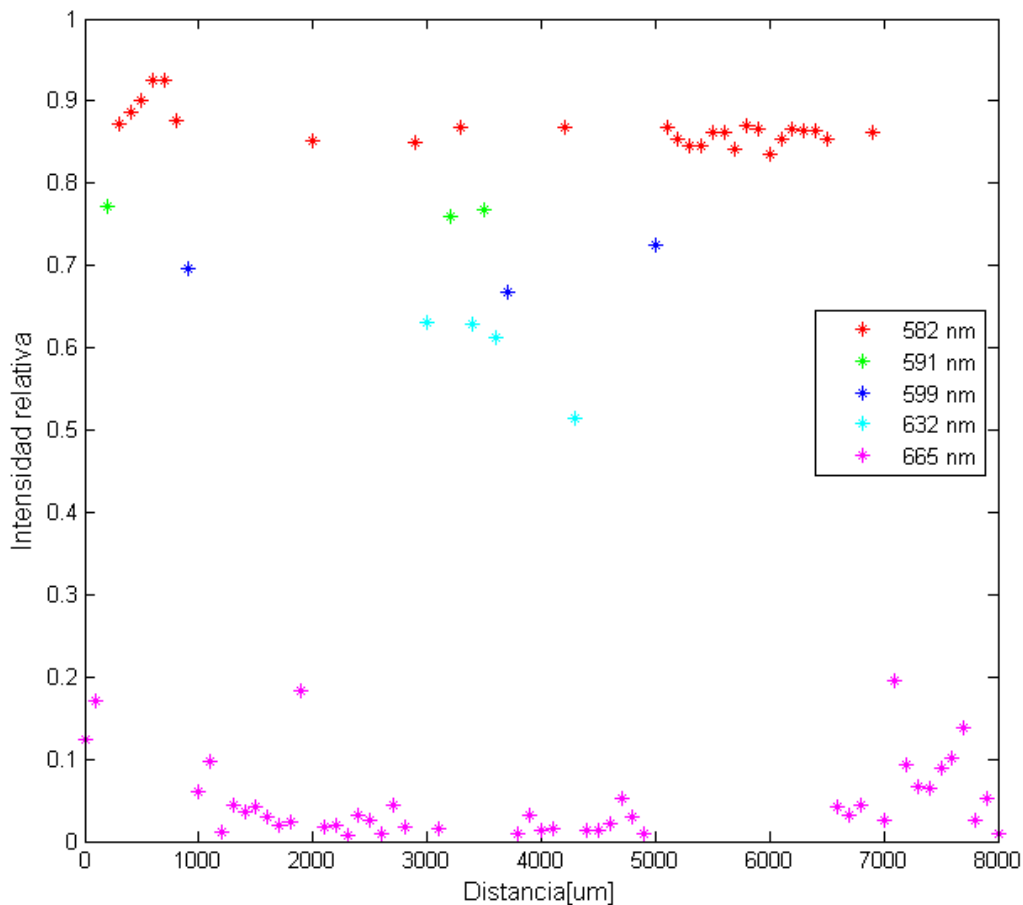


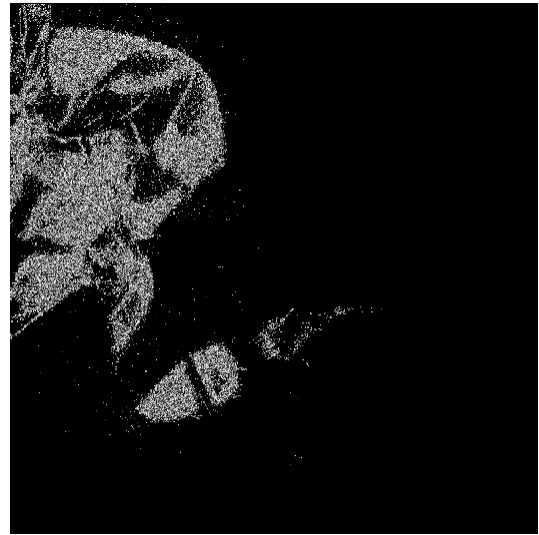
Figura 4.20. Intensidades de los planos que conforman al mosco

En la figura 4.20, el último plano confocal tiene baja intensidad, lo que representa cambios más drásticos, lo que no sé mostro en los resultados de la hoja de pino. Consideró que se debe a que el elemento bajo estudio presenta en sus planos un porcentaje muy bajo de reflexión, lo que provoca que se vea tan atenuada los planos confocales calibrados en el sistema, presentando también absorción en algunas zonas de la muestra. Además me permite decir que el grosor de la cabeza debe ser mayor a los 26 μm, asimismo al realizar la reconstrucción de dicha imagen en los planos a 591 nm y 599 nm también se presentaron las misma dificultades que en el caso de la hoja de pino. En la imagen 3D al ver el resultado en general solo puedo ver cambios en intensidad que presenta la mosca pero no se observa tan detalle como el MC comercial, pero a simple vista se puede ver que el resultado hace referencia a la muestra.

Para este caso se analizó cada plano confocal y se comparó con el resultado obtenido con el MC Nikon, para el caso $z=0$ en la figura 4.21 se puede observar la formación de la pata de la mosca y, a simple vista existen similitud en las imágenes obtenidas.



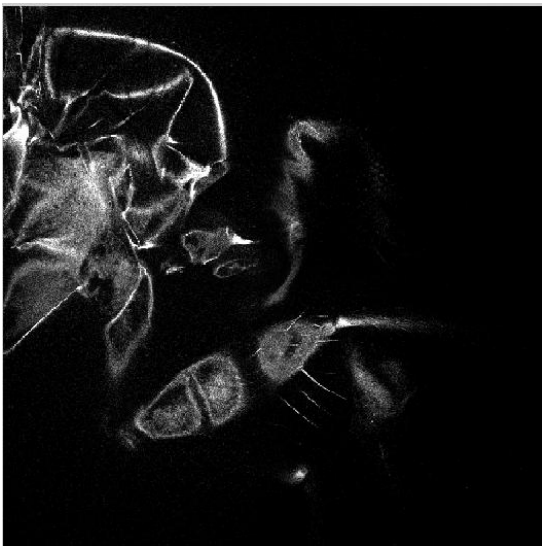
a)



b)

Figura 4.21. a) Microscopio confocal comercial; b) MCMLFO propuesto.

Para el segundo caso donde $z=4 \mu\text{m}$, en la figura 4.22 se pueden observar la comparación entre ambos resultados, la similitud sigue existiendo, sin embargo en el caso del MCMLFO hay zonas que aparecen como escaneadas, lo que puede indicar un error que se presentó durante el escaneo de la muestra y su información fue adquirida por el sistema propuesto en esta tesis.



a)



b)

Figura 4.22. a) Microscopio confocal comercial; b) MCMLFO propuesto.

Para el plano $z=9 \mu\text{m}$, se puede observar en la figura 4.23 que la similitud entre los resultados obtenidos sigue existiendo, sin embargo en este resultado en particular se puede observar muy bien el contorno de la muestra, sin embargo resalta que del

MCMLFO las intensidades obtenidas son más marcadas en comparación con el MC comercial, además de que se puede determinar que la pata del mosquito se encuentra por encima de la cabeza algo que simple vista no se puede observar.

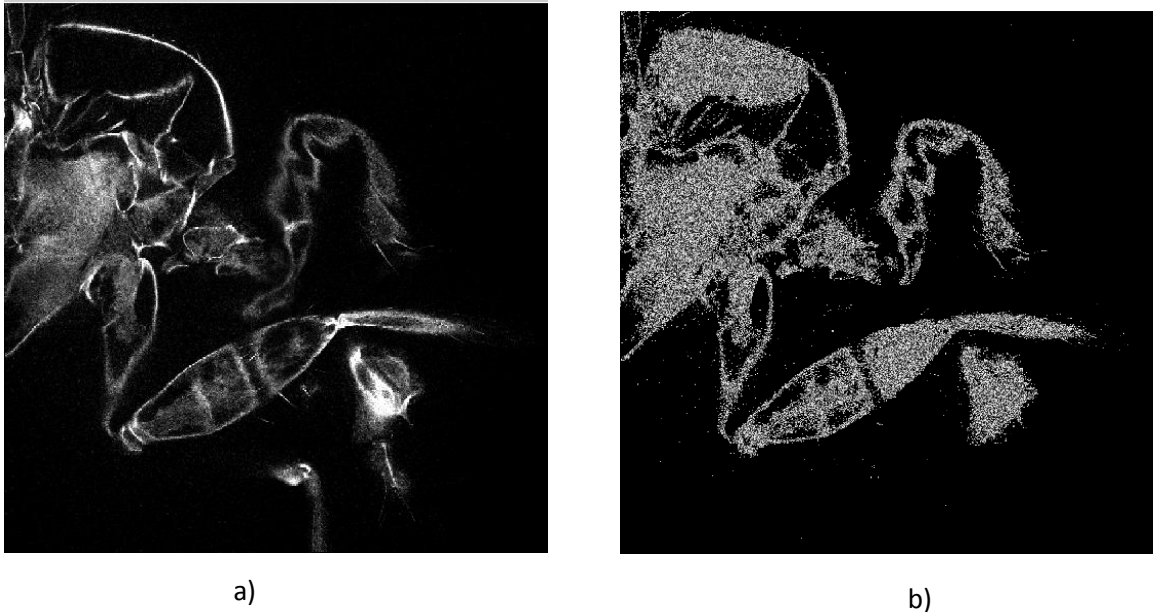


Figura 4.23. a) Microscopio confocal comercial; b) MCMLFO propuesto.

Al realizar el procesamiento en los últimos 2 planos confocales, las intensidades resultantes ya se encontraban a nivel de ruido, es decir, no se logró recuperar la información proveniente de esos planos. Se atribuye principalmente a la composición de la muestra y a la profundidad, debido a que la luz recorrió mayor distancia, provocando que la cantidad de luz que se recuperó fue demasiado baja que se colocó a nivel de ruido impidiendo su interpretación y la formación de dichos planos confocales.

Al realizar el escaneo de la muestra en el MC Nikon, con los parámetros ya antes mencionados, presentó la misma dificultad que la hoja de pino, pero en este caso el escaneo si se realizó de manera automática pero llevo bastantes horas. Consistió en realizar un escaneo x, y y z al mismo tiempo sobre la muestra, permitiendo obtener el dato de que el grosor de la cabeza, que fue de $130 \mu\text{m}$, que se encuentra fuera del rango en que se calibro el dispositivo propuesto. Además permitió confirmar lo antes mencionado, el grosor de la muestra estaba por encima de $26 \mu\text{m}$, en la figura 4.24 se muestra el resultado en 2D de la muestra obtenida en este dispositivo comercial.



Figura 4.24. Imagen 2D del mosco adquirida con el microscopio confocal Nikon.

En la figura 4.25 se muestra la cabeza del mosco en 3D, con un grosor de 128 μm , donde se puede observar cómo se encuentra conformado este elemento biológico.



Escalas - Ancho: 1165 μm / Largo: 1165 μm / Profundidad: 128 μm

Figura 4.25. Imagen 3D del mosco adquirida con el microscopio confocal Nikon.

Con las imágenes adquiridas del MCMLFO y del MC Nikon, el siguiente paso fue realizar una comparación entre dichos resultados, para ello se empleó el análisis por ventana con base en intensidad. Las imágenes 2D se encuentran conformadas de $n \times n$ píxeles, la ventana consiste en tomar 4 píxeles ($n \times n$) de toda la matriz que comprende la imagen y realizar un barrido respetando estas dimensiones, donde cada ventana será comparada en intensidad entre las dos imágenes a través de su media, logrando obtener un

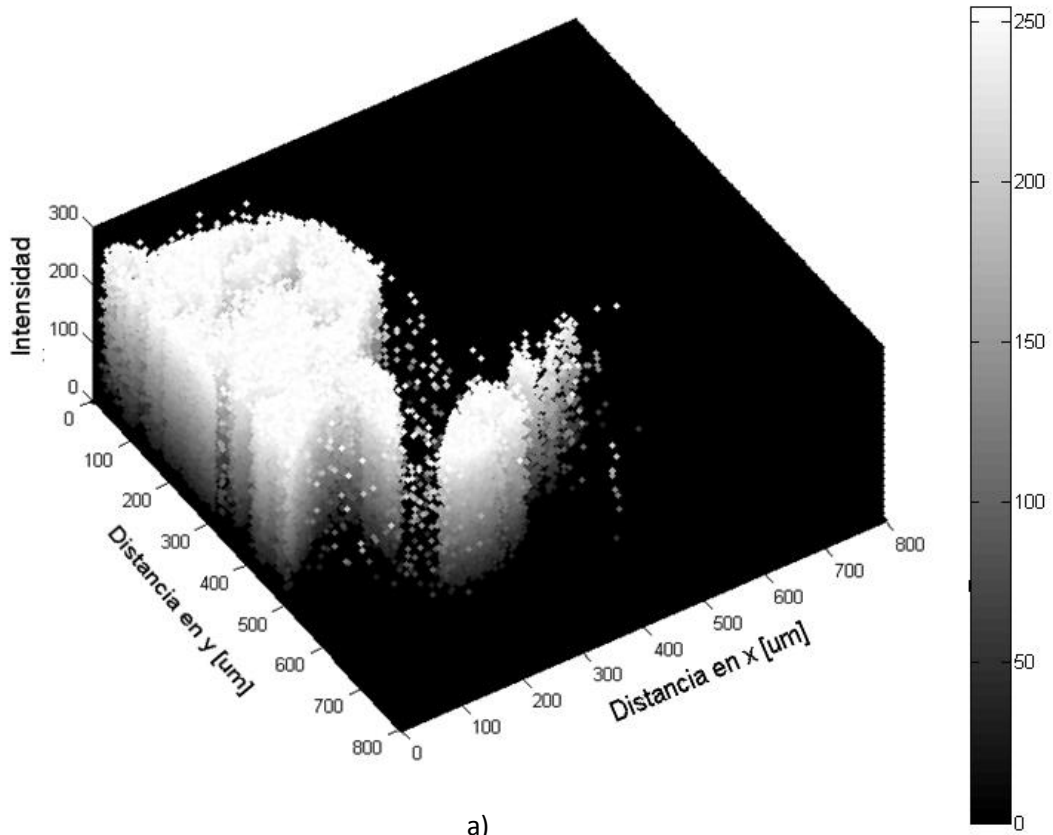
porcentaje que asocie la similitud entre imágenes. Este proceso se realizó para las tres imágenes antes mostradas, además de realizar análisis de diferentes tamaños de ventana y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 4.3 Porcentaje de similitud en cada una de las imágenes adquiridas por el MCMLFO y comparada con el MC Nikon.

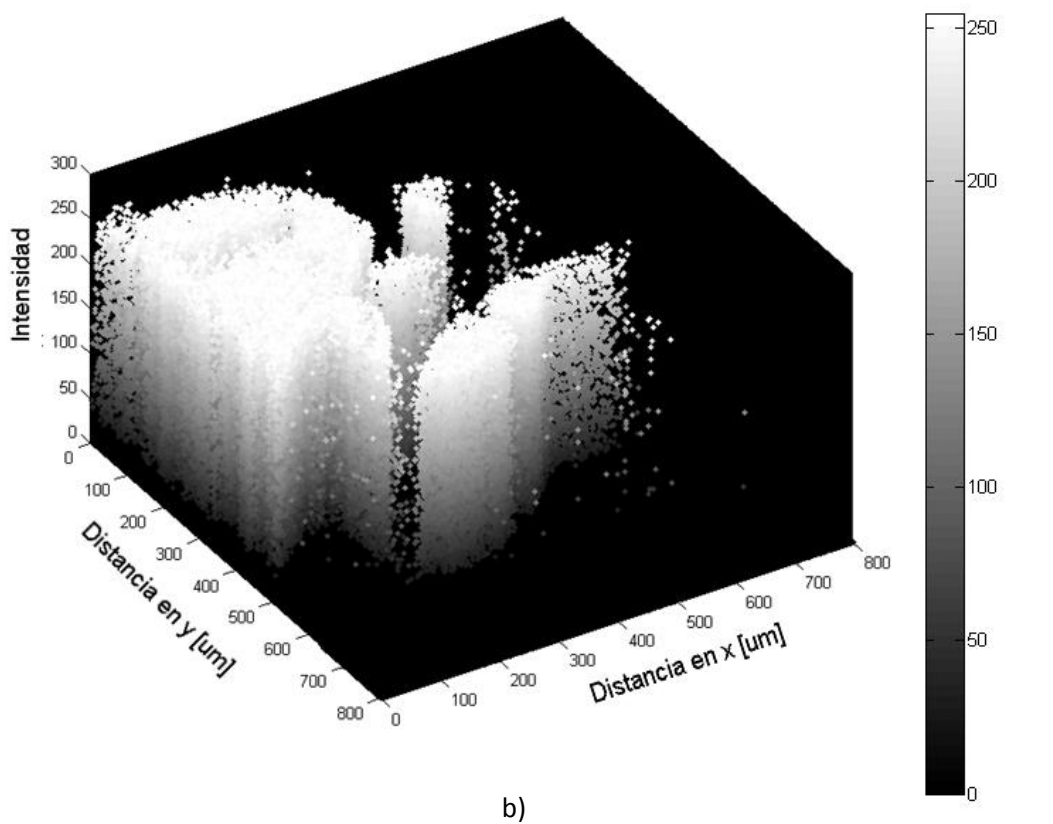
nxn	Imagen 1 (z=0 μm)	Imagen 2 (z=4 μm)	Imagen 3 (z=9 μm)
	MCMLFO (%)	MCMLFO (%)	MCMLFO (%)
2x2	62.0	40.5	30.0
3x3	50.6	31.4	19.2
5x5	42.4	22.0	9.8
10x10	32.8	14.6	5.4
20x20	21.2	12.7	4.2
50x50	12.8	8.3	3.5
150x150	5.5	4.5	1.1

En la tabla 4.3 la imagen que presenta mayor similitud con la obtenida en el MC comercial es la primera, se obtuvo un 62% en una ventana de 2x2, al analizarla detalladamente se encontró que este porcentaje pertenece a los límites del mosco, es decir, al contorno de la muestra biológica y donde se presenta la mayor discrepancia es al interior del mosco. Para la segunda y tercera imagen el porcentaje de similitud disminuye considerablemente, donde a simple vista la imagen procesada del MCMLFO presenta bastantes variaciones en su conformación en comparación con la imagen del MC Nikon, y este análisis lo confirma, además de que no presenta esos pequeños detalles que en la imagen del MC comercial si se observan. Con este análisis puedo determinar que el dispositivo propuesto es capaz de identificar las fronteras de los elementos bajo estudio, asimismo el aumentar el tamaño de la ventana provoca que se tomen en cuenta más valores en la comparación, generando que la discrepancia aumente en la zona de análisis y por ende la similitud en las imágenes disminuya.

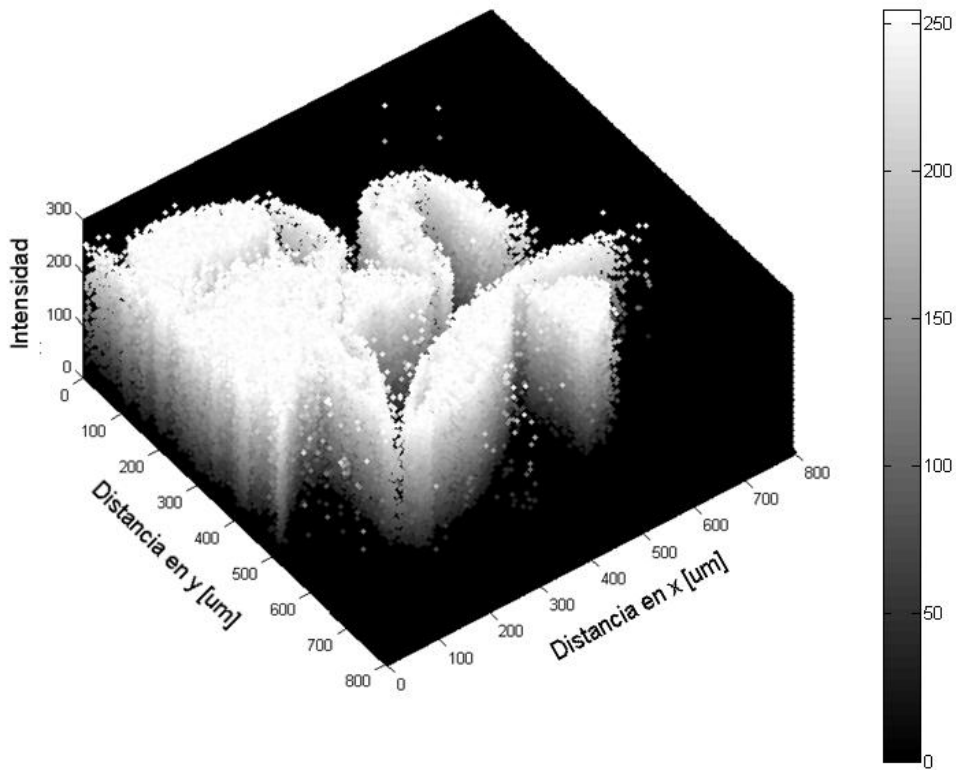
A continuación se muestran imágenes 3D por intensidad de cada uno de los planos confocales obtenidos.



a)



b)



c)

Figura 4.30. Imágenes en 3D de los planos confocales: a) $z=0 \mu\text{m}$ b) $z=4 \mu\text{m}$ c) $z=9 \mu\text{m}$.

En estos resultados, se aprecia que las muestras biológicas para el MCMLFO son elementos complejos y debido a la poca intensidad de luz que se recupera, se pierden detalles en la reconstrucción topográfica respecto a las imágenes confocales del microscopio Nikon. Como se observa en la reconstrucción 3D del mosquito, donde se obtiene una buena definición del objeto en cuanto a la región escaneada correspondiente a la cabeza, el cuerpo o las patas. Sin embargo las imágenes tienen baja definición en términos de los detalles del objeto, como sucedió en el caso anterior.

El MCMLFO propuesto en este trabajo tiene como parte de las principales ventajas; que se eliminó el mecanismo axial que analiza las muestras en el eje confocal z , que no necesita autoenfoco para adquirir información de los diferentes planos que conforman a las muestras que no son uniformes. Puede analizar y obtener las dimensiones de muestras en 2D que presenten dentro de su composición algún elemento reflejante. Sin embargo sería deseable contar con más planos confocales y una mayor profundidad de escaneo que la obtenida de $26 \mu\text{m}$, que representa ya un buen resultado de diseño similar consulta en la literatura. El procesamiento para poder realizar una reconstrucción en 3D está basado en la intensidad, además de que el tratamiento de la información es manual y no es al instante como en MC comercial Nikon. Todo lo anterior invita a considerar que el diseño es prometedor para seguir mejorándolo, además de que cumple con los objetivos planteados.

Referencias

[38] Nikon (2019). Microscopios confocales - A1R+ STORM. Recuperado de: https://www.microscope.healthcare.nikon.com/es_AMS/products/confocal-microscopes/a1hd25-a1rhd25

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se mostró el diseño, implementación y caracterización experimental de un microscopio confocal multilongitud de onda en fibra óptica (MCMLFO), el cual basa su principio en la formación de los planos confocales a partir de la aberración cromática presente en las lentes y que evita el desplazamiento mecánico axial del sistema óptico. El principal objetivo fue obtener una resolución micrométrica, además de utilizar la fibra óptica como filtro espacial eliminando el usar un filtro adicional (apertura circular). Se implementó un algoritmo basado en intensidad de los espectros de reflexión adquirido durante el escaneo de las muestras que permitió reconstruir la superficie de la misma y obtener las primeras imágenes confocales de muestras biológicas en el Grupo de Dispositivos Biomédicos del ICAT.

El uso de una fuente de ancho espectral amplio permitió la caracterización de 5 planos confocales con una penetración de hasta $26\ \mu\text{m}$, lo que representó una limitante en el análisis de las muestras estudiadas en este trabajo. Esta limitante está asociada principalmente al comportamiento multimodal del acoplador utilizado, debido a su operación en el rango espectral VIS, teniendo como consecuencia la pérdida de información. La resolución axial que se obtuvo en la caracterización del dispositivo, al no ser lineal se tiene una mínima de $z_{\text{exp}} = 4\ \mu\text{m}$ y una máxima de $z_{\text{exp}} = 9\ \mu\text{m}$, si la comparamos con los artículos encontrados que hacen referencia a diseños de microscopios confocales, es muy buena, ya que los mejores dispositivos tienen una resolución axial de $3.6\ \mu\text{m}$.

Para la validación del funcionamiento del sistema se analizaron diferentes tipos de muestras entre las que destacaron los elementos reflejantes y biológicos, las cuales fueron comparadas con un microscopio confocal comercial de la marca Nikon. Donde en el caso del elemento reflejante se obtuvieron muy buenos resultados, obteniendo las dimensiones del mismo $1.00 \pm 0.01\ [\text{mm}]$, principalmente por las características de la muestra. Sin embargo, para las muestras biológicas, donde se analizó una hoja de pino y una mosca, los resultados de las imágenes visualmente son parecidas a las obtenidas con el microscopio confocal Nikon. Realizando una comparación en intensidad, esta mostró que la mejor imagen presenta un 62% de equidad con la obtenida en el microscopio confocal comercial. Este porcentaje pertenece principalmente a los bordes entre el elemento bajo estudio y la superficie, teniendo mayores discrepancias al interior de la muestra. Lo que indica que el dispositivo permite identificar las fronteras que componen a una muestra y será necesario aumentar la sensibilidad del MCMLFO. La principal complejidad que se obtuvo durante el análisis de este tipo de muestras, es que los cambios de intensidad son menos perceptibles y por ende su interpretación es más uniforme.

Este diseño ayudó a entender el funcionamiento de un microscopio confocal, mostrando sus ventajas y desventajas, permitiendo replantear las características y elementos que podrían potencializar la propuesta planteada y caracterizada en esta tesis. El trabajo realizado cumple con los objetivos planteados, se tiene el primer prototipo de microscopio

confocal multilongitud de onda en fibra óptica en el Grupo de Dispositivos Biomédicos que permite el análisis de muestras reflejantes con una penetración hasta 26 μm con interrogación de cinco planos confocales, además de obtener las alteraciones o fronteras de la superficie bajo análisis, realizando un escaneo sobre un plano (x , y) y haciendo uso de una fuente de ancho espectral amplio con una resolución espacial de 1 μm . Sin embargo es necesario seguir explorando alternativas que permitan alcanzar altas resoluciones.

PERSPECTIVAS

Este primer prototipo trajo consigo buenos resultados, sin embargo su análisis invita a mejorar su diseño, características y algunos elementos que ayuden a impulsar una mejora en el análisis de diferentes tipos de muestras. Por esta razón como trabajo a futuro se plantean diferentes alternativas en el diseño del MCMLFO, entre las que destaco las siguientes:

- Se tienen dos alternativas para ser usadas como fuentes en el diseño del microscopio confocal, por un lado se plantea el uso de una mejor fuente de amplio ancho espectral que se encuentre en un rango más cercano a los azules o llevar el estudio a otro rango espectral de menor extinción para el caso de muestras biológicas, como tejido, piel, etcétera. También se puede explorar el rango IR para optimizar el desempeño de los acopladores 2x1 en fibra óptica que permitan que se capture una mayor cantidad de luz aumentando la sensibilidad.
- Hacer uso de otros diseños de acopladores en óptica integrada con desempeño optimizado en el rango de la fuente a usar para obtener el máximo rendimiento de estos elementos y que ayude a canalizar la mayor cantidad de luz en las muestras y tener vías de incidencia y reflexión balanceadas.
- Incorporar el desplazamiento automatizado 2D en el plano de escaneo, así como incorporar procesamiento en las imágenes, y que estas se puedan obtener en el momento de la adquisición de la información.
- Para el caso de las lentes se plantea el uso de dimensiones más pequeñas con un foco de unos pocos centímetros, para evitar diseños robustos, además de contar con una mayor cantidad de planos confocales que ayuden en el análisis o estudio axial de muestras con profundidades mayores a 26 μm .
- Con toda la información reunida y con algunas mejoras aquí planteadas, se tendría como resultado un microscopio confocal de buen desempeño, que es capaz de analizar diferentes tipos de muestras, con fuentes intercambiables y de no difícil acceso como un LED, con un menor valor comercial.

Anexo A. Hoja de Datos - Acoplador 2x1 @ 1550 nm

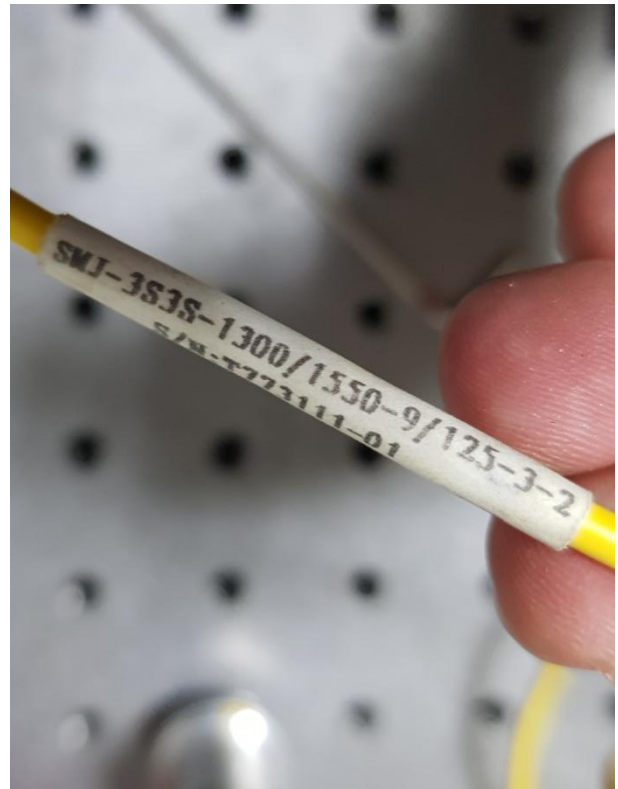
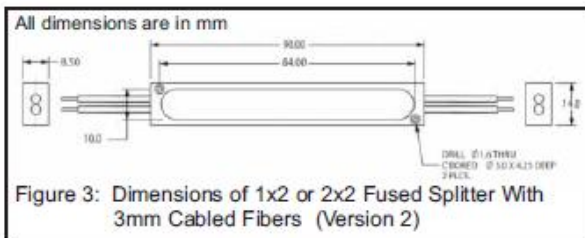
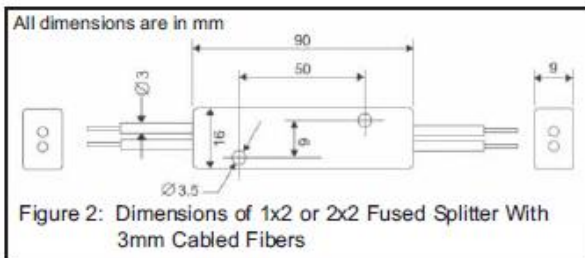
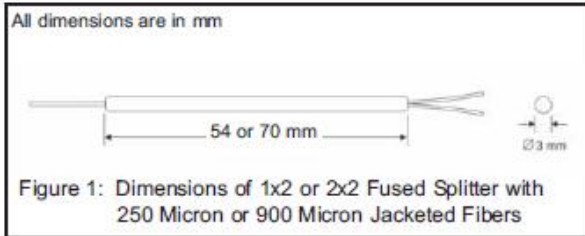
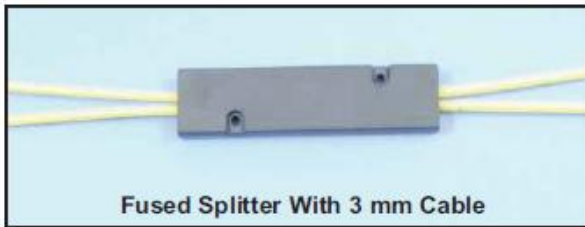


Figura A.1. Dimensiones del Acoplador 2x1 @ 1550 nm [39]

Especificaciones [39]:

Longitudes de onda estándar: 405nm, 488nm, 633nm, 830nm, 1300-1350nm, 1490-1550nm y 2005nm monomodal con acopladores.

Dimensiones de la fibra: Monomodo: 3.5/125 para 488nm y 514nm, 4/125 para 633nm, 5/125 para 830 nm y 9/125 para 1300nm y 1550 nm

Pérdidas: <0.3 dB para acopladores 1300nm y 1550nm. <0.5 para acopladores 830nm. <1.0 dB para longitudes de onda entre 480nm y 700nm.

Direccionalidad: 50dB o superior

Precisión de la relación de división. Dentro $\pm 3\%$ para longitudes de onda de 850nm, 1300nm y 1550nm. Dentro $\pm 5\%$ para longitudes de onda entre 405nm y 850nm.

Rango de Temperatura. -40 °C a 85 °C

Anexo B. Constantes de dispersión de los materiales ópticos

1. Material BK7 [29]

Constantes de Dispersión	
B_1	1.03961212
B_2	0.231792344
B_3	1.010469450
C_1	0.00600069867
C_2	0.0200179144
C_3	103.5606530

5. Sílice fundida [33]

Constantes de Dispersión	
B_1	0.6961663
B_2	0.4079426
B_3	0.8974794
C_1	0.0684043
C_2	0.1162414
C_3	9.896161

2. Material SF5 [30]

Constantes de Dispersión	
B_1	1.52481889
B_2	0.187085527
B_3	1.427290150
C_1	0.01125475600
C_2	0.0588995392
C_3	129.1416750

3. Material SF10 [31]

Constantes de Dispersión	
B_1	1.62153902
B_2	0.256287842
B_3	1.644475520
C_1	0.01222414570
C_2	0.0595736775
C_3	147.4687930

4. Material SF11 [32]

Constantes de Dispersión	
B_1	1.73759695
B_2	0.313747346
B_3	1.898781010
C_1	0.01318870700
C_2	0.0623068142
C_3	155.2362900

Anexo C. Hoja de datos de la fibra SMF-28

La fibra óptica SMF-28 es una fibra óptica conforme a la Recomendación UIT-T G.652.D con las tecnologías mejoradas de baja pérdida. La fibra SMF-28 ofrece especificaciones líderes en la industria para valores de dispersión en modo de atenuación, pérdida de macrocobertura y polarización, que proporcionan una base sólida para nuevos despliegues de red, así como para actualizaciones de redes existentes [40].

Tabla C.1. Especificaciones Geométricas, Mecánicas y Ópticas de la fibra SMF-28 [40]

Diámetro del núcleo	9 μm
Diámetro del revestimiento	125 \pm 1 μm
Longitudes de onda donde opera	1330/1550 nm
Apertura numérica	0.14
Diámetro del recubrimiento	242 \pm 5 μm
Temperatura de operación	-60 hasta 85 $^{\circ}\text{C}$

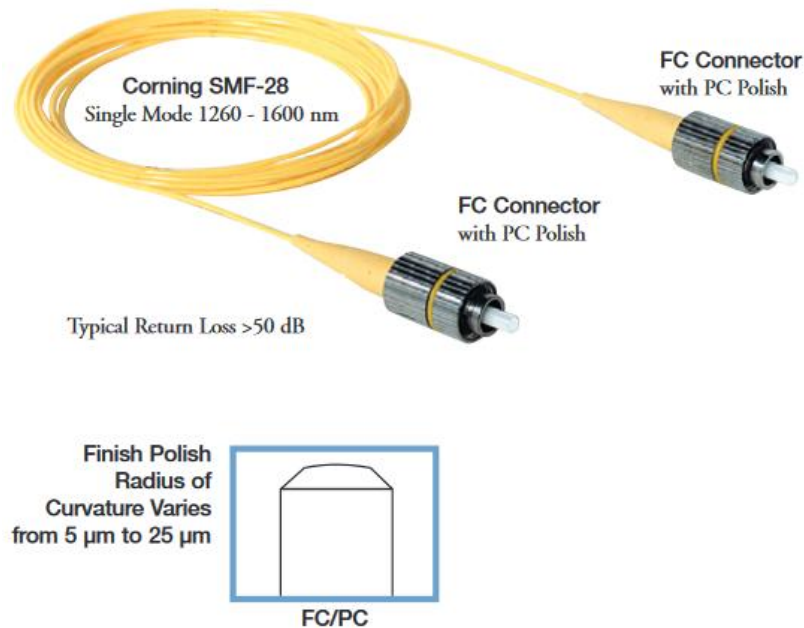


Figura C.1. Fibra SMF-28 [40]

Anexo D. Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM

Características del Microscopio Confocal Nikon A1R+STORM [38]:

- Microscopio invertido
- Campo claro, DIC
- Platina Motorizada en XYZ
- Incubadora
- Sistema “Perfect Focus”
- Longitudes de excitación: 405, 488, 561 y 640nm
- Detector estandar con dos PMT galvano y dos PMT GaAsP (azul, verde, rojo, rojo lejano)
- Detector de luz transmitida (DIC, Nomarski)
- Detector espectral de hasta 32 canales
- Objetivos: 10, 20, 40, 60 y 100x
- Usos recomendados:
 - Captura de imágenes de alta resolución de estructuras marcadas con más de 3 fluorocromos simultáneos y campo claro, en un plano o apilados en el eje Z (z stack).
 - Captura de imágenes de alta resolución de estructuras marcadas con más de 3 fluorocromos simultáneos y campo claro, en mosaico (XY o XYZ).
 - Captura espectral (lambda stack).
 - FRET
 - FRAP
 - TIRF
 - Time Lapse
 - Live Cell Imaging
 - STORM (super-resolución)



Figura D.1. Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM [38]

Referencias

- [1] H.-J. Jordan, M. Wegner, and H. Tiziani, "Highly accurate non-contact characterization of engineering surfaces using confocal microscopy," *Meas. Sci. Technol.* 9(7), 1142–1151 (1998).
- [2]. L. Yang, G. Wang, J. Wang, and Z. Xu, "Surface profilometry with a fibre optical confocal scanning microscope," *Meas. Sci. Technol.* 11(12), 1786–1791 (2000).
- [3]. J. Cohen-Sabban, J. Gaillard-Groleas, and P. J. Crepin, "Extended-field confocal imaging for 3D surface sensing," *Proc. SPIE* 5252, 366–371 (2004).
- [4]. J. R. Garzon, J. Meneses, G. Tribillion, T. Gharbi, and A. Plata, "Chromatic confocal microscopy by means of continuum light generated through a standard single mode fiber," *J. Opt. A, Pure Appl. Opt.* 6(6), 544–548 (2004).
- [5]. R. Juskaitis and T. Wilson, "Imaging in reciprocal fibre-optic based confocal scanning microscopes," *Opt. Commun.* 92(4–6), 315–325 (1992).
- [6]. E. Shafir and G. Berkovic, "Multi-wavelength fiber optic displacement sensing," *Proc. SPIE* 5952, 59520X (2005).
- [7]. G. Berkovic, E. Shafir, M. A. Golub, M. Bril, and V. Shurman, "Multiple-fiber and multiplewavelength confocal sensing with diffractive optical elements," *IEEE Sensors* 8(7), 1089–1092 (2008).
- [8] Shoude Chang, Youxin Mao, Costel Fluerau, and Sherif Sherif, "Optical coherence tomography: technology and applications", *Proc. SPIE* 7156, 715606 (2009).
- [9] Ruvalcaba Morales, Raúl.(2009). Desarrollo de un Microscopio Confocal para la obtención de imágenes en 3D de dispositivos desarrollados con microlitografía. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [10] García Aguilera, Marco A. (2015). Diseño y construcción de un microscopio confocal. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [11] J. B. Pawley, ed. (2006), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, (3rd ed.), Estados Unidos, Springer, p. 1-536.
- [12] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019) Introductory Confocal Concepts. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts>
- [13] Hyun-Joon Shin, Mark C. Pierce, Daesung Lee, Hyejun Ra, Olav Solgaard, and Rebecca Richards-Kortum, "Fiber-optic confocal microscope using a MEMS scanner and miniature objective lens", *Optics Express* 15(15), 9113-912 (2007).

- [14]. K. Shi, S. H. Nam, P. Li, S. Yin, and Z. Liu, "Wavelength division multiplexed confocal microscopy using supercontinuum," *Opt. Commun.* 263(2), 156–162 (2006).
- [15] Cory Olsovsky, Ryan Shelton, Oscar Carrasco-Zevallos, Brian E. Applegate, and Kristen C. Maitland, "Chromatic confocal microscopy for multi-depth imaging of epithelial tissue", *Biomedical Optics Express* 4(5), 732-740 (2013).
- [16]. H. J. Tiziani and H.-M. Uhde, "Three-dimensional image sensing by chromatic confocal microscopy," *Appl. Opt.* 33(10), 1838–1843 (1994).
- [17]. T. Dabbs and M. Glass, "Fiber-optic confocal microscope: FOCON," *Appl. Opt.* 31(16), 3030–3035 (1992).
- [18]. E. Shafir and G. Berkovic, "Expanding the realm of fiber optic confocal sensing for probing position, displacement, and velocity," *Appl. Opt.* 45(30), 7772–7777 (2006).
- [19] B. Saleh, M. Teich, (1991). *Fundamentals of Photonics*. Estados Unidos. John Wiley & Sons.
- [20] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019). Numerical Aperture and Image Resolution. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/tutorials/imageformation-airyna>
- [21] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019). Aberrations in Confocal Microscopy. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/aberrations-in-confocal-microscopy>.
- [22] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019). Critical Aspects of Confocal Microscopy. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/critical-aspects-of-confocal-microscopy>
- [23] MicroscopyU. The source for Microscopy Education (2019). Confocal Reflection Microscopy. Recuperado de: <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/confocal-reflection-microscopy>
- [24] Edmund Optics (2019). Limitations on Resolution and Contrast: The Airy Disk. Recuperado de: <https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/imaging/limitations-on-resolution-and-contrast-the-airy-disk/>
- [25] Edmund Optics (2019) Diffraction Limit. Recuperado de: <https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/imaging/diffraction-limit/>
- [26] Hecht, Eugene (2000). *Óptica*. (Tercera ed.) Madrid. Addison Wesley Iberoamericana, 722 pp.
- [27] Botero Arbeláez Marcela, Arbeláez Salazar Osiel, Mendoza Vargas Jairo A. (2007). Método ANOVA utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. *Scientia et Technica* Año XIII. 533-537.

- [28]. Senar J.C. (1999). La Medición de la Repetibilidad y el Error de Medida. Temas actuales en Etología. 53-64.
- [29] SCHOTT optical glass collection (2013). BK7 [Hoja de datos]. Recuperado de: https://www.schott.com/d/advanced_optics/ac85c64c-60a0-4113-a9df-23ee1be20428/1.14/schott-optical-glass-collection-datasheets-english-may-2019.pdf.
- [30] SCHOTT optical glass collection (2013). SF5 [Hoja de datos]. Recuperado de: https://www.schott.com/d/advanced_optics/ac85c64c-60a0-4113-a9df-23ee1be20428/1.14/schott-optical-glass-collection-datasheets-english-may-2019.pdf.
- [31] SCHOTT optical glass collection (2013). SF10 [Hoja de datos]. Recuperado de: https://www.schott.com/d/advanced_optics/ac85c64c-60a0-4113-a9df-23ee1be20428/1.14/schott-optical-glass-collection-datasheets-english-may-2019.pdf.
- [32] SCHOTT optical glass collection (2013). SF11 [Hoja de datos]. Recuperado de: https://www.schott.com/d/advanced_optics/ac85c64c-60a0-4113-a9df-23ee1be20428/1.14/schott-optical-glass-collection-datasheets-english-may-2019.pdf.
- [33] I. H. Malitson, "Interspecimen Comparison of the Refractive Index of Fused Silica", *Journal of the Optical Society of America* 55(10), 1205–1209(1965).
- [34]. C. Montgomery, Douglas. (2006). Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. (Segunda ed.). México. McGraw-Hill.
- [35]. Devore L, Jay. (2010). Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. (Octava ed.). México. Cengage Learning.
- [36] Botero Arbeláez Marcela, Arbeláez Salazar Osiel, Mendoza Vargas Jairo A. (2007). Método ANOVA utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. *Scientia et Technica* Año XIII. 533-537.
- [37]. Senar J.C. (1999). La Medición de la Repetibilidad y el Error de Medida. Temas actuales en Etología. 53-64.
- [38] Nikon (2019). Microscopios confocales - A1R+ STORM. Recuperado de: https://www.microscope.healthcare.nikon.com/es_AMS/products/confocal-microscopes/a1hd25-a1rhd25
- [39] OzOptics (2019). Fused couplers – fiber optic [Hoja de datos] . Recuperado de: <https://www.ozoptics.com/>
- [40]. Thorlabs (2019). Single Mode Fiber - 28 [Hoja de datos]. Recuperado de: <https://www.thorlabs.com/drawings/1c56130442625207-9E6EF7EC-0402-CB2B-82B5E09E6FA90CF7/SMF-28-100-SpecSheet.pdf>
- [41] Edmund Optics (2019). Double-Convex (DCX) Lenses. Recuperado de: <https://www.edmundoptics.com/f/uncoated-double-convex-dcx-lenses/12004/>

[42] MathWorks. (2016). Code Examples. Recuperado de: <http://www.mathworks.com/products/matlab/examples.html>.

[43] Douglas C., Giancoli. (2006). Física: principios y aplicaciones. (Sexta ed.). México. Pearson Educación