Sección Especial / Special Section: X Reunión Nacional de Óptica

Microscopía de barrido con muestreo espacial del plano del detector

Scanning microscopy with spatial sampling of the detector plane

Emilio Sánchez-Ortiga[1,*,S], Genaro Saavedra[1,S], Colin Sheppard[2], Ana Doblas[1,S], Manuel Martínez-Corral[1,S], Pedro Andrés[1,S]

1. Departamento de Óptica, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Spain.
2. Division of Bioengineering, National University of Singapore, 7 Engineering Drive 1, Singapore.

(*) Email: Emilio.Sanchez@uv.es S: miembro de SEDOPTICA / SEDOPTICA member

Recibido / Received: 10/12/2012. Revisado / Revised: 26/02/2013. Aceptado / Accepted: 01/03/2013.
DOI: http://dx.doi.org/10.7149/OPA.46.2.137

RESUMEN:

Se presenta la implementación de un microscopio confocal de barrido en el cual se emplea como detector una cámara CCD. Este tipo de detección posee numerosas ventajas con respecto a la detección típica en la microscopia confocal. Se demuestra la aplicabilidad de nuestro sistema que, al realizar un muestreo espacial de la distribución de intensidades en el plano del detector, permite llevar a cabo técnicas de aumento de la resolución tridimensional del sistema.

Palabras clave: Microscopía Láser Confocal de Barrido, Imagen 3D, Super-Resolución.

ABSTRACT:

We present the implementation of a confocal scanning microscope in which the signal detection is performed through a matrix sensor, specifically, a CCD camera. This kind of detection has several advantages over the conventional detection in confocal microscopes. One of those advantages is the possibility to recover information of the sample that vanishes when the confocal image is directly acquired by the integration of light into a signal. We demonstrate the applicability of the system which allows implementing super-resolution techniques in a very easy manner.

Key words: Confocal Laser Scanning Microscopy, 3D Imaging, Super-Resolution.

REFERENCIAS Y ENLACES / REFERENCES AND LINKS

[1]. E. Sánchez-Ortiga, C. J. R. Sheppard, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, A. Doblas, A. Calatayud, "Subtractive imaging in confocal scanning microscopy using a CCD camera as a detector", *Opt. Lett.* **37**, 1280-1282 (2012). DOI

[2]. C. J. R. Sheppard, A. Choudhury, "Image formation in scanning microscope", *Opt. Acta* **24**, 1051-1073 (1977). DOI

[3]. T. Wilson, R. Carlini, "Size of the detector in confocal imaging systems", *Opt. Lett*. **12**, 227-229 (1987). DOI

[4]. T. Wilson, Y R. Carlini, "Effect of detector displacement in confocal imaging system", *Appl. Opt.* **27**, 3791-3799 (1988). DOI

[5]. R. Heitzmann, V. Sarafis, P. Munroe, J. Nailon, Q. S. Hanley, T. M. Jovin, "Resolution enhancement by subtraction of confocal signals taken at different pinhole sizes", *Micron* **34**, 293-300 (2003). DOI

[6]. C. J. R. Sheppard, C. J. Cogswell, "Confocal microscopy with detector arrays", *J. Mod. Opt.* **37**, 267-279 (1990). DOI

[7]. M. Martínez-Corral, G. Saavedra, "The resolution challenge in 3D optical microscopy", *Prog. Opt.* **53**, 1-67 (2009). DOI

 © Sociedad Española de Óptica

1. Introducción

La microscopía confocal se ha erigido en una de las técnicas más útiles y sencillas de realizar dentro de la microscopía óptica moderna. A pesar de que fue propuesta hace más de medio siglo ha sido en las últimas dos décadas cuando ha encontrado su auge gracias a diferentes desarrollos tecnológicos. Dentro de estos desarrollos se encuentran el láser, los detectores de área extensa, así como los sistemas de barrido con precisión sub-micrométrica. La idea clave de este microscopio óptico, que rompe ciertas barreras de la microscopia convencional en términos de resolución, es la conjunción de una iluminación puntual de la muestra y una detección puntual de la luz reflejada por la misma. Como se muestra en la Fig. 1, esto se consigue proyectando sobre la muestra, a través de un objetivo de microscopio, el haz láser emitido a la salida de una fibra óptica. La luz que refleja dicha muestra es colectada por el mismo objetivo de microscopio y, mediante un divisor de haz (BS), es proyectada sobre un orificio de dimensiones microscópicas. Este orificio, al que llamamos *pinhole*, actúa eliminando la luz que proviene de planos desenfocados de la muestra confiriéndo al sistema su capacidad de seccionado óptico. La luz que atraviesa el *pinhole* llega a un detector de área extensa, normalmente un tubo fotomultiplicador (PMT), que la transfiere en una señal eléctrica. Dicha señal es almacenada en un ordenador como un píxel de la imagen confocal. Para obtener una imagen bidimensional (2D) es necesario realizar un barrido trasversal de la muestra. Asimismo, gracias a la capacidad de seccionado óptico del sistema, es posible realizar una imagen sintética tridimensional (3D) a partir de la compilación de pilas de imágenes 2D capturadas mediante un barrido axial de la muestra.

En el sistema que proponemos se sustituye el *pinhole* y el detector de área extensa por una cámara CCD [1]. Ésta se sitúa en el plano del *pinhole*, es decir, en el plano del espacio imagen conjugado con el plano focal objeto del objetivo de microscopio. Como veremos, este tipo de detección alternativa no sólo permite obtener imágenes equivalentes a las de un microscopio confocal si no que le confiere al sistema una mayor flexibilidad y permite la implementación de una manera sencilla de técnicas de aumento de resolución.

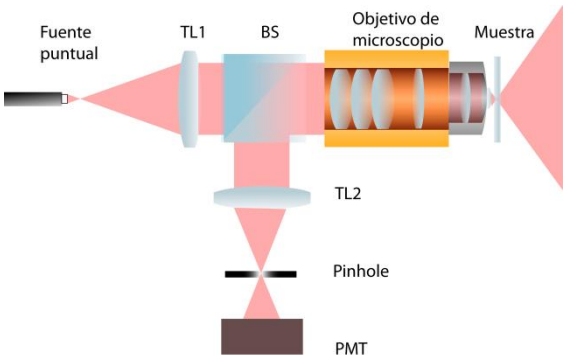


Fig. 1. Esquema de un microscopio confocal de barrido.

2. Fundamento teórico

En esta sección realizaremos una descripción teórica de la formación de imágenes en un microscopio confocal de barrido teniendo en cuenta la forma del detector. Introduciremos también la técnica conocida como imagen confocal substractiva que produce un aumento en la resolución tridimensional del sistema. Esto servirá de motivación para la propuesta de detección matricial empleando una cámara que realice un muestreo espacial del plano del detector. Hay que puntualizar que utilizaremos los términos detector y *pinhole* indistintamente ya que éste último es el elemento que afecta al proceso de formación de imágenes en microscopia confocal.

2.a. Formación de imágenes confocal

A continuación vamos a considerar la formación de imágenes coherente a través de un microscopio confocal de barrido. Para ello, suponemos que el sistema tiene simetría de revolución entorno al eje óptico y que se tiene un detector puntual centrado en dicho eje y situado en el plano imagen del sistema de colección. Tras realizar un barrido tridimensional, teniendo un objeto con una reflectancia en amplitudes dada por $O(r,z)$ y para una longitud de onda de iluminación λ, la distribución de intensidades de la imagen confocal viene dada por [2]:

$$I(v,u) = |O(v,u) \otimes_3 h_1(v,u)h_2(v,u)|^2, \quad (1)$$

siendo $v = (2\pi/\lambda)\cdot r\sin\alpha$ y $u = (8\pi/\lambda)\cdot z\sin^2(\alpha/2)$ las coordenadas normalizadas en la

 © Sociedad Española de Óptica

dirección radial y axial, respectivamente, α el ángulo de apertura del objetivo y h_1, h_2, la respuesta impulsional en amplitudes de los sistemas de iluminación y colección dadas por:

$$h_i(v,u) = \\ = i\lambda e^{-is_0 u}\int_0^1 P_i(\rho)\, e^{-\frac{1}{2}u\rho^2} J_0(v\rho)\rho d\rho, \quad (2)$$

siendo $i = 1, 2$, $P_i(\rho)$ la función pupila del objetivo de microscopio y $J_0(v\rho)$ la función de Bessel de primera especie de orden cero. Si asumimos que los sistemas de colección e iluminación son iguales, se puede demostrar que la respuesta impulsional en intensidades del microscopio confocal en las direcciones transversal y axial puede escribirse en la forma

$$h_{conf}(v, u=0) = \left|\frac{2J_1(v)}{v}\right|^4, \\ h_{conf}(v=0, u) = \left|\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right|^4, \quad (3)$$

donde $J_1(v)$ es la función de Bessel de primera especie de orden uno. Es fácil ver que ambas respuestas corresponden a la respuesta impulsional de un sistema convencional elevada al cuadrado. Como consecuencia, la respuesta impulsional 3D de un microscopio confocal es más estrecha que la de un microscopio convencional lo que supone una mayor resolución. En la Fig. 2 se representa un corte axial de la respuesta impulsional de ambos microscopios.

2.b. Influencia de la geometría del detector

En la sección anterior hemos considerado que la imagen confocal se obtiene a través de la integración de la luz que atraviesa un *pinhole* puntual centrado eje en una señal para cada posición de barrido. En la práctica el detector posee un cierto tamaño ya que la relación señal ruido disminuye drásticamente a medida que se reduce el tamaño del detector. Se puede demostrar [3] que para un detector circular de tamaño finito, $D(v)$, la respuesta impulsional del microscopio confocal viene dada por:

$$h_{conf}(v,u) = \\ = |h_1(v,u)|^2\{|h_1(v,u)|^2 \otimes D(v)\}, \quad (4)$$

donde

$$D(v) = \begin{cases} 1 & \text{si } v < a, \\ 0 & \text{si } v > a, \end{cases} \quad (5)$$

y siendo a el radio del detector. Para los dos casos límites del tamaño del detector se obtiene una expresión sencilla de la respuesta impulsional en intensidades del microscopio confocal:

$$h_{conf}(v,u) = \\ = \begin{cases} |h_1(v,u)h_2(v,u)|^2, & \text{si } a \to 0, \\ |h_1(v,u)|^2, & \text{si } a \to \infty. \end{cases} \quad (6)$$

Como vemos, si el detector es puntual se obtiene la respuesta impusional de un microscopio confocal ideal mientras que si el tamaño del detector tiende a infinito (equivaldría a un microscopio de barrido sin

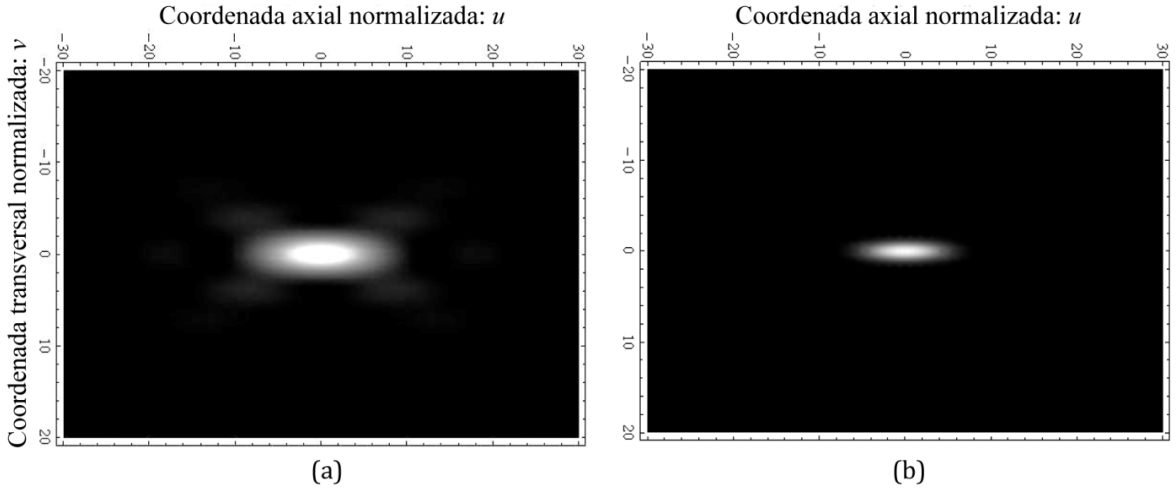


Fig. 2. Representación de un corte axial de la respuesta impulsional en un (a) microscopio convencional, (b) microscopio confocal.

 © Sociedad Española de Óptica

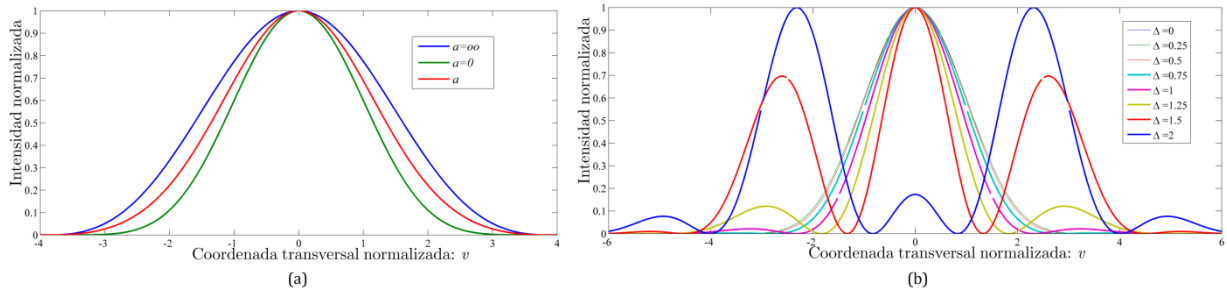


Fig. 1. Respuesta impulsional en intensidades de un microscopio confocal de barrido para (a) distintos radios a del detector, (b) un detector puntual separado una distancia Δ con respecto al eje óptico en la dirección transversal.

pinhole) la respuesta impulsional es exactamente la misma que para un microscopio convencional. En el resto de casos estaríamos en una situación intermedia, es decir, dependiendo del tamaño del detector se produciría un ensanchamiento equivalente de la respuesta confocal ideal (ver Fig. 3(a)).

Otro de los parámetros que influyen en la distribución de intensidades de un microscopio confocal de barrido es la posición del detector. Una vez conocido el efecto del tamaño del detector, es interesante estudiar como varía la respuesta impulsional del sistema cuando se considera un detector puntual desplazado una cantidad Δ con respecto al eje óptico. Es fácil ver que dicha respuesta, en la dirección transversal, puede expresarse como [4]:

$$h_{conf}(v,u=0) = \left|\frac{2J_1\left(v-\frac{\Delta}{2}\right)}{v-\frac{\Delta}{2}}\right|^2 \left|\frac{2J_1\left(v+\frac{\Delta}{2}\right)}{v+\frac{\Delta}{2}}\right|^2, \quad (7)$$

En las curvas de la Fig. 3(b), se observa que existen ciertas posiciones del detector que producen una respuesta impulsional en la dirección transversal más estrecha que para el caso en el que éste se encuentra centrado en el eje óptico. Sin embargo, conforme aumenta la separación con respecto al eje óptico, aparecen unos lóbulos laterales que distorsionan dicha respuesta. En realidad la influencia del tamaño del detector puede entenderse a partir de lo que ocurre cuando se tiene un detector infinitesimal desplazado. Para un cierto tamaño del detector, la respuesta impulsional vendría dada por la integración de la respuesta de distintos detectores infinitesimales desplazados dentro del área del detector de tamaño finito.

2.c. Mejora en la resolución tridimensional por combinación de señales para distintos tamaños de pinhole

Como hemos visto en la sección 2(b), la geometría y la posición del detector tienen un papel fundamental en las características de la distribución de intensidades imagen obtenida en un microscopio confocal. Si bien supone una limitación práctica a la hora de aproximarse al caso ideal, es posible aprovechar esta dependencia para aumentar la resolución tridimensional del sistema. Existen una serie de técnicas que permiten mejorar la resolución de un microscopio confocal por medio de la combinación de señales obtenidas con detectores de distinta geometría. Una de dichas técnicas es la conocida como imagen substractiva en microscopia confocal [3]. Se basa en la substracción de las señales, apropiadamente escaladas, obtenidas barriendo la muestra en ausencia de *pinhole* (o con un pinhole relativamente grande) y con un *pinhole* de tamaño óptimo para la detección confocal. De este modo, la distribución de intensidades obtenida para la imagen substractiva se puede escribir como:

$$I_{sub}(v,u) = I_{cerrado}(v,u) - \gamma I_{abierto}(v,u), \quad (8)$$

siendo γ un factor de peso que permite escalar ambas señales convenientemente. La respuesta impulsional de la imagen substractiva en las direcciones transversal y axial viene dada por:

$$h_{sub}(v,u=0) = \left|\frac{2J_1(v)}{v}\right|^4 - \gamma\left|\frac{2J_1(v)}{v}\right|^2,$$
$$h_{sub}(v=0,u) = \left|\frac{\sin\left(\frac{u}{4}\right)}{u/4}\right|^4 - \gamma\left|\frac{\sin\left(\frac{u}{4}\right)}{u/4}\right|^2, \quad (9)$$

 © Sociedad Española de Óptica

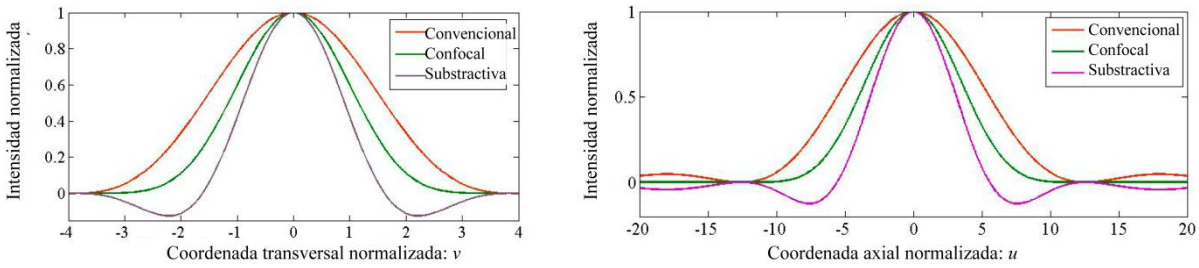


Fig. 2. Representación de la respuesta impulsional en las direcciones transversal y axial para los microscopios convencional y confocal y las obtenidas mediante la técnica de imagen substractiva.

Para obtener una respuesta óptima el factor de peso se escoge de forma que:

$$\mathrm{MAX}[h_{abierto}(v=0,u)] = \\ = \frac{1}{2}\mathrm{MAX}[h_{cerrado}(v=0,u)]. \quad (10)$$

En la Fig. 4 se puede observar como la técnica de imagen substractiva presenta una respuesta impulsional más estrecha tanto en la dirección transversal como en la axial con respecto a la del microscopio confocal y, por tanto, una mejor resolución.

Para poder llevar a cabo esta técnica en un microscopio confocal estándar son necesarios dos brazos de colección: uno de los brazos sin *pinhole* y el otro con un *pinhole* de pequeño tamaño. Lógicamente este proceso requiere de una perfecta alineación entre ambos brazos de colección de tal forma que las señales substraídas correspondan a zonas equivalentes de la muestra.

2.d. Muestreo espacial en el plano del detector

Como hemos visto el microscopio confocal, empleado en condiciones óptimas, posee mayor resolución que un microscopio convencional. Este hecho puede resultar paradójico teniendo en cuenta que en el microscopio confocal se desecha cierta información por medio del empleo del *pinhole*. Dicha paradoja no es tal ya que, como se deduce de los cálculos anteriores, se esta incorporando al sistema información acerca de como se distribuye espacialmente la luz en el plano del detector. Es fácil comprender, pues, el papel crucial que juega el tamaño del *pinhole* en la detección confocal. Idealmente dicha detección se realiza con un *pinhole* infinitesimal. En la práctica se emplean diferentes tamaños de *pinhole* (dependiendo del objetivo de microscopio empleado) que van de unas pocas decenas a cientos de micras. A medida que el tamaño del pinhole aumenta la imagen confocal se "emborrona" como consecuencia de la adición de información a la imagen confocal ideal, aproximándose a la que se obtendría con un microscopio convencional cuando el tamaño del detector es suficientemente grande. Mediante este razonamiento se puede concluir que al integrar en una señal la luz que atraviesa el *pinhole* se está perdiendo gran cantidad de información. Esto sugiere un tipo alternativo de detección confocal, mediante el uso de un detector matricial, en el que se realiza un muestreo espacial en el plano del detector de la distribución de intensidades imagen del campo reflejado por la muestra para cada posición de barrido. El empleo de un detector matricial en microscopía confocal fue propuesto años atrás [6]. Sin embargo, al no existir un detector óptimo para llevarla a cabo, este tipo de detección no tuvo un gran impacto. El rápido desarrollo de los sensores CCD en los últimos años hace viable la detección matricial presentándola no sólo como una seria alternativa a la detección usual, si no abriendo la posibilidad de realizar un procesado de la señal confocal para cada posición de barrido de la muestra.

Para una cámara con (N_x, N_y) píxeles separados una distancia (Δ_x, Δ_y), suponiendo que éstos son infinitesimales, colocada en el plano imagen, la función del detector matricial vendría dada por:

 © Sociedad Española de Óptica

$$D_{mn}(x,y,u) = \sum_{m=1}^{N_x}\sum_{n=1}^{N_y} \delta\left(x - \left(m - \frac{N_x}{2}\right)\Delta_x, y - \left(n - \frac{N_y}{2}\right)\Delta_y\right), \quad (11)$$

donde hemos escrito la coordenada radial normalizada en función de sus componentes transversales (x, y) y donde hemos supuesto que el píxel central de la cámara se sitúa centrado sobre eje óptico. Es directo ver que se registran distintas señales correspondientes a detectores desplazados con respecto al eje óptico para cada posición de barrido de la muestra. Por tanto, es posible combinar dichas señales elementales para obtener una señal equivalente a la detección confocal, con la flexibilidad de poder variar tanto el tamaño del detector como su posición. Asimismo, surge la posibilidad de obtener señales correspondientes a distintos detectores en paralelo, de tal forma que es directo implementar técnicas de aumento de resolución como la presentada en la subsección anterior.

3. Montaje experimental

Como hemos dicho, el microscopio confocal propuesto se basa en la sustitución del *pinhole* y el detector de área extensa por una cámara CCD situada en el plano del detector. El software que hemos desarrollado permite controlar distintos parámetros de la cámara como son la ganancia, tiempo de exposición y el número de píxeles activos de la cámara así como su posición. La señal para una posición de barrido se obtiene mediante la integración numérica de los píxeles activos de la cámara. La posibilidad de elegir el número de píxeles activos de la cámara es muy relevante a la hora de realizar una imagen ya que el tiempo de respuesta de la cámara depende de dicho número y, a su vez, determina el tiempo de adquisición para cada posición del barrido. Una de las ventajas del sistema es que de esta manera tenemos un *pinhole* sintético de tamaño variable y cuya alineación puede llevarse a cabo de manera muy sencilla. Obviamente, dicho pinhole sintético presentará una forma cuadrada (o bien de círculo pixelado). Por otra parte, si la muestra se ilumina por transmisión con una fuente extensa de luz blanca, es posible identificar la zona de barrido mediante la visualización directa de la imagen de campo claro capturada por la cámara CCD. Además, si el sensor posee tres canales cromáticos se puede llevar a cabo la adquisición en color de imágenes confocales (dentro de las limitaciones espectrales del filtro de Bayer del sensor). De esta forma, nuestra implementación también supone una reducción de coste debido a que la realización de detección en color en un microscopio confocal estándar exige tres tubos fotomultiplicadores con sus correspondientes filtros. Las ventajas anteriores sumadas a la posibilidad de realizar diferentes técnicas basadas en el muestreo espacial del plano del detector otorgan gran robustez y flexibilidad al sistema.

El microscopio de barrido propuesto se muestra en la Fig. 5. En éste se emplea un láser He-Ne de longitud de onda 632.8 nm acoplado a una fibra óptica para iluminar puntualmente la muestra. El barrido de la muestra se realiza mediante un sistema piezoeléctrico (PZT) que permite desplazamientos tridimensionales de 0.1 μm. En la mayoría de los resultados que se mostrarán más adelante se empleó un objetivo de microscopio de aumento 100× y apertura numérica (AN) 0.9. Dicho objetivo de microscopio está conjugado al infinito por lo que se emplean dos lentes de tubo de 200 mm de distancia focal tanto en iluminación como en

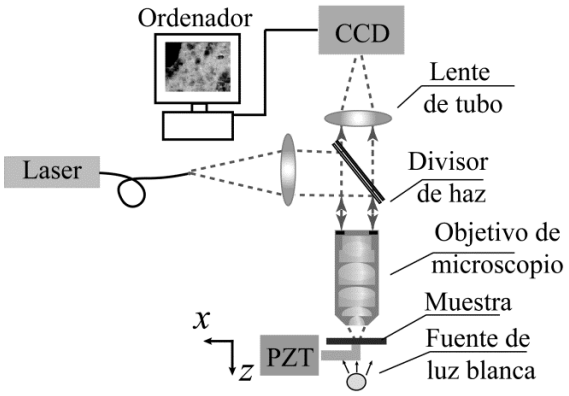


Fig. 5. Esquema del microscopio confocal propuesto en el que se realiza un muestreo espacial del plano del detector para cada posición de barrido de la muestra.

 © Sociedad Española de Óptica

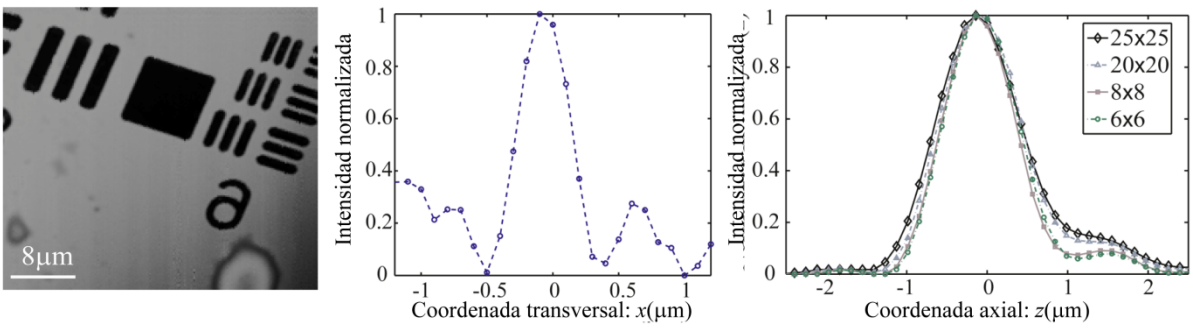
colección. La cámara CCD empleada posee 8-bits, 1600×1400 píxeles de 4.4 μm de tamaño. Si se emplea todo el detector la máxima velocidad de adquisición es de 6 frames por segundos. Sin embargo, para los tamaños típicos del pinhole (entre 4×4 y 20×20 píxeles activos) la velocidad de adquisición aumenta hasta cerca de los 500 frames por segundo.

4. Resultados

En primer lugar probaremos las características del microscopio propuesto como sistema formador de imágenes. Para ello, se realiza la imagen de un test USAF-1951 de alta resolución en negativo, creado por una deposición de cromo sobre vidrio con una serie de líneas transparentes. La imagen obtenida tras el barrido con un *pinhole* sintético de 6x6 píxeles se muestra en la Fig. 6(a). Para evaluar la resolución del sistema en la dirección transversal empleamos una microesfera reflectante con un diámetro más pequeño que la respuesta impulsional del sistema. El perfil obtenido de dicha microesfera se representa en la Fig.6(b). El valor teórico de la anchura a media altura (FWHM) de la respuesta impulsional en la dirección transversal para el objetivo de microscopio usado en este experimento es de 0.7 μm, que coincide con el valor obtenido experimentalmente a partir del perfil de la microesfera. Para evaluar la resolución en la dirección axial se realizó un barrido de un espejo plano en la dirección del eje óptico. La curva obtenida en dicho barrido es una buena aproximación de la respuesta impulsional del sistema en la dirección axial y se conoce como la función $V(z)$. Este proceso lo realizamos para distintos tamaños del pinhole sintético, como puede verse en la Fig. 6(c). La FWHM de la respuesta impulsional teórica en la dirección para un sistema confocal ideal con el objetivo de microscopio empleado es de 1.09 μm, valor al que se aproxima la medida experimental para el *pinhole* sintético más pequeño.

Por último, para comprobar la capacidad de seccionado óptico del sistema se empleó nuevamente el test USAF-1951 pero esta vez inclinado con respecto al eje óptico. Se tomó la imagen para un tamaño de *pinhole* sintético de 50×50 píxeles y otra con 8×8 píxeles. Como era de esperar (ver Fig. 7), para el *pinhole* sintético grande la luz proveniente de planos que están fuera de foco sigue estando presente mientras que en el otro caso dicha luz es bloqueada por el *pinhole* sintético.

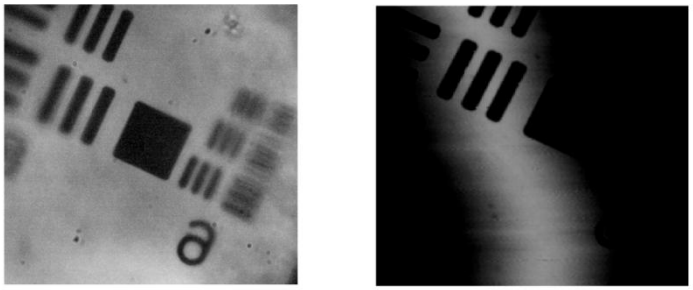
Una vez probada la funcionalidad del sistema veamos cómo implementar la técnica de imagen subtractiva en el mismo. Como dijimos en la sección 2.c, en un microscopio confocal estándar son necesarios dos brazos de colección con distintos tamaños de *pinhole* para poder llevar a cabo la técnica. Sin embargo, con nuestro sistema ambas señales se pueden obtener en paralelo a partir de un único brazo de colección y estando seguros de la perfecta alineación del sistema. Para obtener una imagen substractiva se sigue el siguiente procedimiento: en la adquisición se selecciona un número de píxeles activos relativamente grande, a los que



(a) (b) (c)

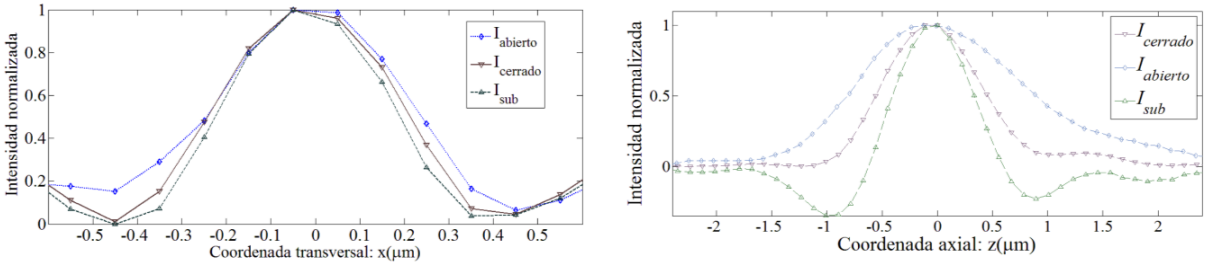
Fig. 6. Evaluación de las características del microscopio como sistema formador de imágenes, (a) Imagen confocal de un test USAF-1951 de alta resolución en negativo, (b) perfil de la imagen obtenida de una microesfera reflectante de 0.1mm de radio (evaluación de la respuesta impulsional en la dirección transversal), (c) curvas V(z) para distintos tamaños del *pinhole* sintético.

 © Sociedad Española de Óptica



(a) (b)

Fig. 7. Imágenes del test USAF-1951 en negativo al que se le ha inducido una cierta inclinación con respecto al eje óptico para tamaños del *pinhole* sintético de: (a) 50×50 píxeles, (b) 8×8 píxeles.



(a) (b)

Fig. 8. Medida de la respuesta impulsional mediante (a) barrido transversal de una microesfera de 0.1 μm de radio y (b) curvas $\boldsymbol{V}(\boldsymbol{z})$.

llamaremos *pinhole* sintético abierto y que sería equivalente a la captura sin *pinhole*. A partir de este *pinhole* sintético es posible extraer la señal que se obtendría con un *pinhole* cerrado aplicando una máscara de recorte que seleccione un pequeño número de píxeles. Para cada posición de barrido se obtienen simultáneamente las señales del *pinhole* sintético abierto y cerrado y, mediante la combinación apropiada de ambas, la señal substractiva.

En la Fig. 8 se muestran las medidas experimentales de la respuesta impulsional transversal y axial para los casos: *pinhole* sintético abierto ($I_{abierto}$) formado por 60×60 píxeles activos, pinhole sintético cerrado ($I_{cerrado}$) formado por 8×8 píxeles activos y la correspondiente señal substractiva (I_{sub}). Al igual que anteriormente, para medir la respuesta impulsional transversal se escaneó una microesfera reflectante mientras que en la dirección axial se realizó el barrido de un espejo plano en la dirección del eje óptico. Como puede verse la respuesta impulsional en ambos casos es sensiblemente más estrecha en la señal substractiva que en la señal confocal.

En la Fig. 9 se muestran imágenes de un corte de piel de cebolla obtenidas con nuestro sistema para los distintos casos. Como puede observarse, la calidad visual de la imagen obtenida mediante la substracción de las señales $I_{abierto}$ e $I_{cerrado}$ ha aumentado notablemente. Esta mejoría se puede evaluar en términos de las frecuencias espaciales que han sido transmitidas a través del sistema, es decir, analizando el dominio de Fourier (ver Fig. 10). Como puede verse, mediante la técnica substractiva se obtiene una mayor eficiencia en la transmisión de frecuencias medias y altas. De hecho, es posible entender el proceso de formación de imágenes confocales substractivas como un cambio en el reparto de pesos otorgado a las componentes espacio-frecuenciales de la imagen confocal. De este modo, las frecuencias espaciales altas en la imagen substractiva se han transmitido con un peso mayor al que tendrían mediante la formación de imágenes puramente confocal.

Con el fin de obtener un resultado más visual que el anterior, empleamos un objetivo de microscopio cuya AN y aumento son inferiores a las del usado anteriormente, en concreto, un 50×

 © Sociedad Española de Óptica

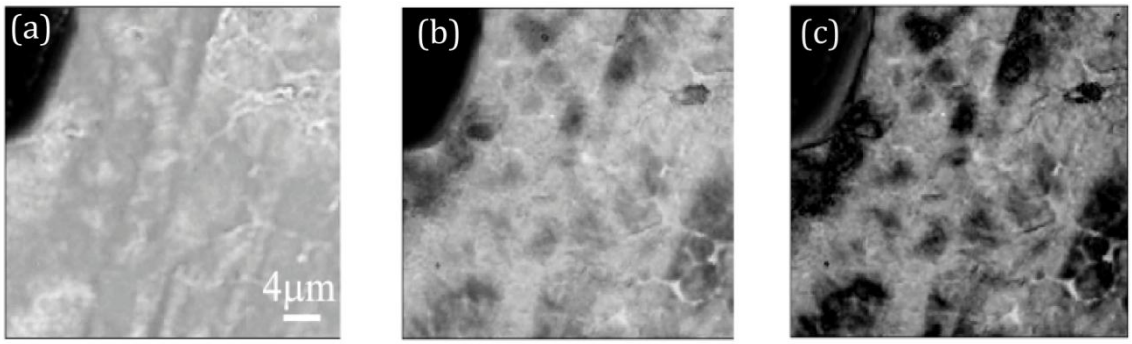


Fig. 9. Imágenes de un corte de piel de cebolla obtenidas con nuestro sistema y sus respectivas transformadas de Fourier para los casos: (a) *pinhole* sintético abierto, (b) *pinhole* sintético cerrado y (c) imagen substractiva resultante. En la transformada de Fourier se representa la frecuencia de corte mediante una circunferencia de línea discontinua.

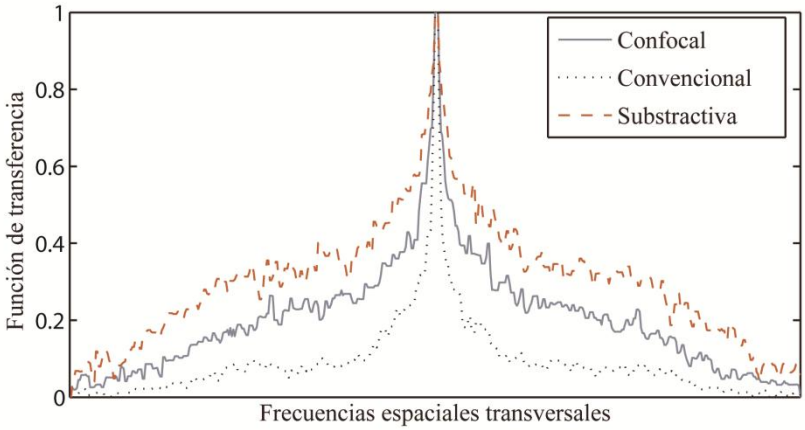


Fig. 3 Perfiles de las transformadas de Fourier para los casos de *pinhole* sintético abierto (convencional), *pinhole* sintético cerrado y la técnica substractiva.

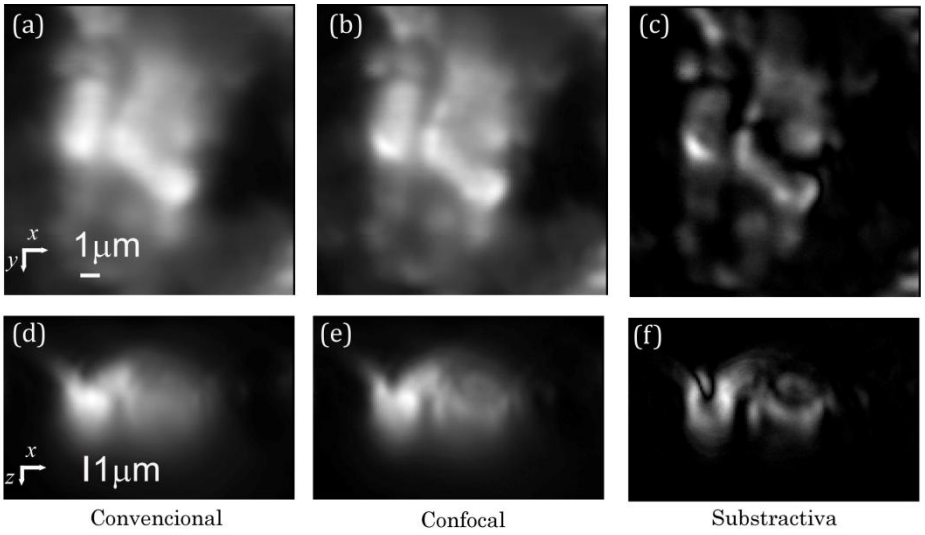


Fig. 11. Cortes transversales y axiales de una muestra de celulosa obtenidos con nuestro sistema para los casos de (a)-(d) un *pinhole* sintético abierto (convencional), (b)-(e) un *pinhole* sintético cerrado (confocal) y (c)-(f) la obtenida mediante la combinación de ambas (substractiva).

 © Sociedad Española de Óptica

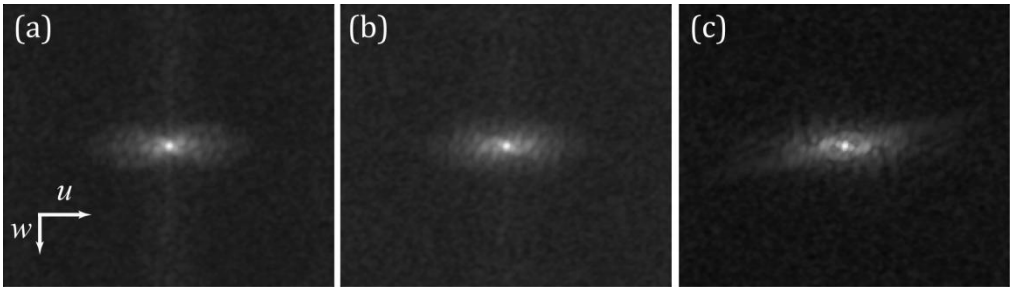


Fig. 12. Transformadas de Fourier de los cortes axiales correspondientes a los casos (a) *pinhole* sintético abierto, (b) *pinhole* sintético cerrado y (c) técnica substractiva. Las coordenadas ***u*** y ***w*** corresponden a las frecuencias espaciales en la dirección transversal y axial, respectivamente.

y 0.55 AN. Como objeto se emplean fibras de celulosa. En la Fig. 11 se muestra un corte transversal y uno axial de las imágenes obtenidas para *pinhole* abierto, cerrado y con la técnica substractiva. Nótese que, dado que el paso de barrido (0.1 μm) es aproximadamente 10 veces menor que el límite en resolución transversal marcado por la difracción para el objetivo de microscopio empleado, estas imágenes presentan un emborronamiento notable. En este caso, además de la mejoría en la resolución transversal, tanto en los cortes transversales como en los axiales se aprecia una notable mejora en la capacidad de seccionado óptico del sistema cuando se obtiene la imagen substractiva. Para entender mejor este efecto, hemos calculado las funciones de transferencia óptica en la dirección axial para los tres casos bajo estudio. En el caso de *pinhole* sintético abierto, Fig. 12(a), se observa claramente el cono de pérdidas [7]. La presencia de dicho cono implica que las frecuencias axiales no han sido transmitidas a través del sistema. Por otro lado, en las Figs. 12(b)-(c), se comprueba que para la técnica substractiva este cono se ha rellenado con mayor eficiencia que en el caso puramente confocal.

5. Conclusiones

Hemos presentado un tipo de detección alternativa para un microscopio confocal de barrido en el que se realiza un muestreo del plano del detector empleando una cámara CCD. Las señales obtenidas por los distintos píxeles se pueden combinar de distintas formas, de modo que es posible obtener imágenes confocales para distintos tamaños y posiciones del *pinhole* a partir de un único barrido de la muestra. Esto permite implementar técnicas de aumento de resolución tridimensional basadas en la combinación de imágenes confocales obtenidas mediante *pinholes* de distintos tamaños. Como hemos demostrado, el sistema presenta gran robustez y flexibilidad. Además su implementación en un microscopio convencional comercial es directa sin más que añadir una entrada de fibra óptica un cabezal de barrido.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional I+D+I por el proyecto FIS2009-9135 y por la Generalitat Valenciana mediante el proyecto PROMETEO2009-077.

 © Sociedad Española de Óptica