

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 500**

21 Número de solicitud: 201930116

51 Int. Cl.:

G01J 9/00 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

15.02.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.08.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

16.11.2020

Fecha de concesión:

29.07.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

05.08.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALENCIA (100.0%)

Avda. Blasco Ibáñez, 13

46010 Valencia (Valencia) ES

72 Inventor/es:

MARTÍNEZ CORRAL, Manuel;

SAAVEDRA TORTOSA, Genaro;

SÁNCHEZ ORTIGA, Emilio y

TÖRÖK, Peter

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

54 Título: **MICROSCOPIO PARA MEDIDAS CUANTITATIVAS DEL FRENTE DE ONDA, MÓDULO Y KIT PARA MICROSCOPIO, MÉTODO Y PROGRAMA DE ORDENADOR PARA LA RECONSTRUCCIÓN COMPUTACIONAL DEL FRENTE DE ONDA**

57 Resumen:

La presente invención concierne a un microscopio para medidas cuantitativas del frente de onda, que comprende:

- medios para iluminar una muestra (T);
- un objetivo (2);
- una disposición bidimensional ordenada de lentes (3) con un espaciado p_{μ} superior a 500 μm y una apertura relativa inferior a 10;
- un sensor de imagen (4) situado en un espacio de captura (E_c) para recibir la luz dispersada por la muestra (T), y adquirir información espacial e información angular del frente de onda objeto asociado a la misma; y
- una entidad computacional para realizar una reconstrucción computacional del frente de onda objeto a partir de las informaciones espacial y angular.

Otros aspectos de la invención conciernen a un método, un programa de ordenador y un producto que lo incluye, adaptados para realizar las funciones de la entidad computacional del microscopio, así como a un módulo y un kit para microscopio.

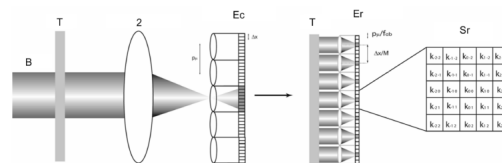


Figura 5

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 779 500 B2

DESCRIPCIÓN

**MICROSCOPIO PARA MEDIDAS CUANTITATIVAS DEL FRENTE DE ONDA,
MÓDULO Y CONJUNTO PARA MICROSCOPIO, MÉTODO Y PROGRAMA DE
ORDENADOR PARA LA RECONSTRUCCIÓN COMPUTACIONAL DEL FRENTE DE
ONDA**

5

Sector de la técnica

La presente invención concierne, en un primer aspecto, a un microscopio para medidas cuantitativas del frente de onda, que comprende una disposición bidimensional ordenada de lentes diseñada de manera tal que permite la medición de variaciones suaves y no
10 suaves del frente de ondas procedente de muestras biológicas, o la obtención de imágenes 3D de gran resolución, incluyendo la de muestras microscópicas.

Un segundo aspecto de la presente invención concierne a un método para la reconstrucción computacional del frente de onda, adaptado para realizar las funciones para las cuales la entidad computacional del microscopio está configurada.

15 En un tercer aspecto, la presente invención concierne a un programa de ordenador para la reconstrucción computacional del frente de onda, que incluye instrucciones de programa que cuando se ejecutan en un procesador implementan el método del segundo aspecto.

En un cuarto aspecto, la presente invención concierne a un producto de programa de
20 ordenador que comprende un medio tangible en el que se encuentra almacenado el programa de ordenador del tercer aspecto.

Un quinto aspecto de la presente invención concierne a un módulo para microscopio, para acoplarse a un puerto de cámara de un microscopio con el fin de construir el microscopio del primer aspecto de la presente invención.

25 Un sexto aspecto de la presente invención concierne a un conjunto para microscopio, que comprende al módulo del quinto aspecto y a un módulo de iluminación acoplable a un puerto de iluminación de un microscopio.

Estado de la técnica anterior

La reconstrucción computacional del frente de ondas es un problema de especial interés
30 en microscopía óptica ya que proporciona información del campo luminoso emitido por muestras 3D, es decir medidas cuantitativas del frente de ondas. En la actualidad este tipo de reconstrucción es proporcionado por dos tipos de microscopios:

1) Microscopios basados en la detección interferencial del frente de ondas mediante un proceso holográfico. Este tipo de sistemas presenta la desventaja de su baja estabilidad y de obtener únicamente información monocular.

2) Microscopios de estructura similar a los sensores de frente de onda basados en el principio de Hartmann-Shack (H-S). Es decir, aquellos que incluyen las características definidas en el preámbulo de la reivindicación 1 de la presente invención. Tal es el caso de los descritos en las siguientes patentes: US9726875B2, US9658443B2, US9679360B2 y US9976911B2.

En tales patentes se proponen distintas técnicas enfocadas en obtener una resolución espacial que sea, en US9726875B2, al menos aceptable para obtener una buena aproximación de los campos de luz reales, que sea, en US9658443B2, incrementada pero limitada por el límite de difracción, que sea, en US9679360B2, mejorada al obtener una imagen compuesta que combine una imagen de intensidad espacial con una de campo de luz, o que sea, en US9976911B2, buena pero sin afectar negativamente a la resolución angular, es decir que se cumpla un compromiso entre resolución espacial y angular.

Si bien cada una de las propuestas hechas en tales patentes consigue en cierto grado mejorar la resolución espacial de los microscopios propuestos en las mismas, tal mejora es claramente mejorable, ya que la mejora en resolución espacial conseguida tiene las limitaciones de los sistemas basados en sensores de Hartmann-Shack, los cuales están limitados en resolución por el número de microlentes (independientemente de la resolución espacial del sensor pixelado). Debido a ello, para optimizar un sensor H-S se debe emplear el mayor número de microlentes posible, cuyo tamaño, consecuentemente, se debe reducir al mínimo. Sin embargo, existen dos limitaciones principales en dicho proceso:

1) El tamaño del *spot* de difracción: Al iluminar una microlente con una onda localmente plana, sobre el sensor (situado en el plano focal imagen de la microlente) se focaliza la luz en forma de un spot de difracción. La posición de este spot con respecto al centro de la microlente se puede relacionar con el ángulo de inclinación de la onda localmente plana. El diámetro del spot, ϕ_{dif} , para una determinada longitud de onda de iluminación, λ , está relacionado con el diámetro, d , y la focal de cada microlente, f , mediante la siguiente fórmula:

$$\phi_{dif} = \frac{\lambda}{NA} \quad (1)$$

donde

$$NA \approx \frac{d}{2f} \quad (2)$$

Por otro lado, para poder muestrear de forma efectiva el spot de difracción a fin de calcular su centroide y, con ello, el desplazamiento relativo del mismo, dicho spot debe ocupar al menos 4 píxeles según el criterio de Nyquist. En este caso, un tamaño de 4
5 píxeles es el valor óptimo ya que dicho valor permite muestrear el spot de forma efectiva con el sensor y, a su vez, permite optimizar el número de ángulos de frente de onda determinado por el desplazamiento del stop,

$$4\Delta x = \phi_{dif} = 2\lambda \frac{f}{d} \quad (3)$$

Se puede ver la limitación que esto supone al introducir valores típicos en la Ec. (3). Para el caso de un sensor con un tamaño de pixel de $\Delta x = 6 \mu m$, una longitud de onda de $\lambda =$
10 $0.5 \mu m$, y tomando un valor típico de tamaño de microlente, $d = 100 \mu m$, la focal que optimizaría el sensor, de acuerdo con la Ec. (3), es $f = 2.5 mm$. Por lo tanto, las microlentes deben situarse en este caso a $2.5 mm$ del sensor. Si se redujese el tamaño de las microlentes, dicho valor se reduciría en la misma proporción, pero esto es posible desde un punto de vista práctico, ya que dicho valor de distancia focal se encuentra muy
15 cercano al límite práctico tanto de fabricación como de alineamiento

A partir de estos cálculos es fácil entender por qué típicamente se emplea un valor de $d = 150 \mu m$ como diámetro de las microlentes y distancia focal de aproximadamente $f = 6 mm$ en los modelos comerciales. Dicho diámetro determina directamente la resolución espacial del sistema. Además, dicho tamaño limita el número de píxeles en los cuales se
20 muestrea el frente de onda para un determinado tamaño de sensor. Típicamente, en los H-S comerciales el número de microlentes, y por tanto el número de píxeles de la reconstrucción varía entre 20×20 y 100×100 (que corresponden a sensores pixelados cuyo tamaño total está comprendido en el rango entre $3.0 \times 3.0 mm$ y, en casos extremos, $15.0 \times 15.0 mm$).

25 2) Resolución angular.

Para cada onda localmente plana, el ángulo máximo que se puede muestrear está relacionado con el máximo desplazamiento del spot dentro de su región. Dado que las

microlentes crean barreras ópticas, dicho desplazamiento se corresponde con la mitad del tamaño de las microlentes,

$$\sin \theta_{max} = \frac{d}{2f}. \quad (4)$$

Por tanto, si se usaran microlentes de $d = 150 \mu m$ y $f = 6 mm$, el ángulo máximo mesurable del frente de onda incidente sería $\theta_{max} = 0.7^\circ$. Es por ello que, normalmente,
5 los sensores H-S se emplean para medir variaciones suaves del frente de onda y su uso para medir la luz dispersada en muestras biológicas es ciertamente limitado.

El razonamiento anterior demuestra por qué en el mejor de los casos los H-S comerciales no miden inclinaciones de las ondas localmente planas superiores a $\theta_{max} = 1.0^\circ$

Por otra parte, los mecanismos propuestos en las patentes mencionadas anteriormente
10 basados en el principio de Hartmann-Shack tienen cierta complejidad, por lo que también sería interesante proponer mecanismos alternativos más simples.

Aparece, por tanto, necesario ofrecer una alternativa al estado de la técnica que cubra las lagunas hallada en el mismo, mediante la provisión de un microscopio que, como las patentes arriba citadas, sea estructuralmente similar a los basados en el principio de
15 Hartmann-Shack pero que ofrezca unos resultados en cuanto a resolución espacial mucho mejores que los proporcionados por los microscopios del estado de la técnica basados en tal principio, así como una simplificación del mismo, y que, asimismo, ofrezca una mayor estabilidad y robustez que los basados en procedimientos interferenciales, e información no únicamente monocular.

20 Explicación de la invención

Con tal fin, la presente invención concierne, en un primer aspecto, a un microscopio para medidas cuantitativas del frente de onda, que comprende, de manera en sí conocida:

- medios de iluminación para iluminar una muestra;
- un objetivo de microscopio configurado y dispuesto para recibir y enfocar luz dispersada
25 por la muestra al ser iluminada con dichos medios de iluminación;
- una disposición bidimensional ordenada de lentes situada en el diafragma de apertura de dicho objetivo de microscopio o en la ubicación de una imagen intermedia del mismo;
- un sensor de imagen formado por una pluralidad de elementos fotodetectores, que está situado en un espacio de captura sobre el plano focal de la disposición bidimensional

ordenada de lentes para recibir dicha luz dispersada por la muestra tras atravesar dicho objetivo de microscopio y dicha disposición bidimensional ordenada de lentes, y adquirir información espacial e información angular del frente de onda objeto asociado a dicha luz proveniente de dicha muestra, quedando enfrentados a cada lente varios de dichos
5 elementos fotodetectores; y

- al menos una entidad computacional conectada operativamente con dicho sensor de imagen y que está configurada y dispuesta para realizar una reconstrucción computacional de dicho frente de onda objeto a partir de dichas informaciones espacial y angular.

10 A diferencia de los microscopios conocidos en el estado de la técnica, en el propuesto por el primer aspecto de la presente invención el espaciado p_{μ} entre los centros de cada dos lentes contiguas de la disposición bidimensional ordenada de lentes es superior a 500 μm y su apertura relativa es inferior a 10.

De acuerdo a un ejemplo de realización, el espaciado entre los centros de cada dos lentes
15 contiguas de la disposición bidimensional ordenada de lentes tiene un valor que está entre 900 μm y 1100 μm , y su apertura relativa tiene un valor que está entre 5 y 7.

Para un ejemplo de realización preferido, el espaciado entre los centros de cada dos lentes contiguas de dicha disposición bidimensional ordenada de lentes tiene un valor entre 990 μm y 1010 μm , preferentemente 1000 μm , y su apertura relativa tiene un valor
20 que está entre 5,8 y 6,2, preferentemente 6.

El microscopio propuesto por el primer aspecto de la invención, por los pocos componentes que incluye y la disposición de los mismos, resulta muy compacto y permite la medición del frente de onda en muestras microscópicas 3D. Su implementación requiere una variación mínima sobre la configuración de un microscopio convencional.
25 Por tanto, es fácil de implementar sobre microscopios convencionales. Al igual que la tecnología Hartmann-Shack este nuevo microscopio está basado en la utilización de una matriz o disposición bidimensional ordenada de lentes. Sin embargo las características de las matrices de lentes son muy distintas. Mientras que los dispositivos de Hartmann-Shack utilizan microlentes de espaciado pequeño (en torno a las 100 μm) y apertura
30 relativa (o "f-number" en inglés) grande (en torno a $f_{\#} \approx 25$), tal y como se ha indicado arriba, el microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención utiliza matrices de lentes de espaciado grande (preferentemente de o en torno a 1000 μm) y apertura relativa pequeña (preferentemente de o alrededor de $f_{\#} \approx 6$).

El microscopio de la presente invención permite obtener resultados inalcanzables con la tecnología Hartmann-Shack, como la medición de variaciones suaves y no suaves del frente de ondas procedente de muestras biológicas, o la obtención imágenes 3D con mayor resolución que la proporcionada por el propio microscopio huésped en que se puede implementar el propuesto por el primer aspecto de la presente invención, para un ejemplo de realización gracias a las condiciones específicas de espaciado entre los centros de cada dos lentes contiguas de la disposición bidimensional ordenada de lentes, y su apertura relativa, que difieren significativamente de las condiciones habituales utilizadas en el estado de la técnica.

- 5 Diferentes tipos de geometría para la disposición bidimensional ordenada de lentes son válidos y están cubiertos por el microscopio del primer aspecto de la presente invención, aunque preferentemente ésta sigue una geometría de red hexagonal o una geometría de matriz cuadrada.

- 15 Ventajosamente, los medios de iluminación luz están configurados para iluminar la muestra con luz parcial o totalmente coherente, y, para un ejemplo de realización preferido, con una haz de luz con un ancho tal que, en ausencia de muestra o para una muestra transparente, el frente de onda objeto será completamente plano y la adquisición en el espacio de captura será exclusivamente el campo de luz dado por una lente central de dicha disposición bidimensional ordenada de lentes.

- 20 De acuerdo a un ejemplo de realización, que se beneficia de la particular disposición bidimensional ordenada de lentes, en especial de su espaciado p_μ y su apertura relativa, la entidad computacional (o entidades computacionales) está configurada para realizar el siguiente doble muestreo en dos espacios recíprocos:

- 25 - un primer muestreo, o muestreo angular, en el espacio en el que se encuentra la disposición bidimensional ordenada de lentes para obtener la información angular del frente de onda objeto, determinándola, la entidad computacional, y con ella su contenido de frecuencias espaciales, en función de la posición o posiciones en el espacio de captura en que el sensor de imagen recibe y adquiere dicha luz emitida por la muestra tras atravesar el objetivo de microscopio y la disposición bidimensional ordenada de lentes; y
- 30 - un segundo muestreo, o muestreo espacial, en el espacio de captura para obtener la información espacial a partir de la intensidad recibida por cada elemento fotodetector, o píxel, del sensor de imagen.

En general, cada elemento fotodetector, o píxel, del sensor de imagen cumple la siguiente restricción:

$$\Delta x \leq \frac{\lambda f_{\mu}}{p_{\mu}}$$

donde Δx es el tamaño del píxel, λ la longitud de onda del haz de iluminación con el que los medios de iluminación iluminan dicha muestra, f_{μ} la distancia focal de las lentes de dicha disposición bidimensional ordenada de lentes y p_{μ} el espaciado entre los centros de cada dos lentes contiguas de dichas lentes.

Según un ejemplo de realización, la entidad computacional está configurada para realizar una transposición de uno de los dos espacios recíprocos para situar a ambas informaciones, la espacial y la angular, en el mismo espacio, o espacio de reconstrucción, situado virtualmente sobre el espacio objeto, donde dicho espacio de reconstrucción consta de L/N regiones, donde L es el número de elemento fotodetectores, o píxeles, del sensor de imagen y N es el número de lentes de la disposición bidimensional ordenada de lentes, de manera que se realiza un único muestreo local de ondas planas del frente de onda objeto que incluye al mencionado muestreo espacial con una periodo de $\Delta x/M$ donde $M = -f_{\mu}/f_{ob}$ y f_{ob} es la distancia focal del objetivo de microscopio, y al citado muestreo angular con un periodo de p_{μ}/f_{ob} .

Para una implementación de dicho ejemplo de realización, la entidad computacional está configurada para, con el fin de realizar la citada reconstrucción computacional, interpretar el mencionado espacio de reconstrucción como un sistema de captura sintético en el cual se coloca una disposición bidimensional ordenada de lentes de espaciado entre los centros de cada dos lentes contiguas $\Delta x/M$, de manera que para cada posición de muestreo espacial l , el frente de onda objeto $o(x)$ se muestrea localmente, de forma que la intensidad de la luz recibida en cada elemento fotodetector o píxel I_{lm} , representa una medida de la composición angular del frente de onda objeto.

La entidad computacional está configurada para, de acuerdo a un ejemplo de realización, con el fin de realizar la mencionada reconstrucción computacional, considerar que en cada subregión del espacio traspuesto, es decir el reconstrucción, se realiza un muestreo local en ondas planas del frente de onda objeto, donde cada píxel de una subregión del espacio traspuesto se corresponde con una dirección de propagación de las ondas planas que componen el frente de onda objeto en dicha zona.

Asimismo, la entidad computacional también está configurada, de acuerdo a una implementación de dicho ejemplo de realización, para determinar, para una subregión dada por el superíndice l , la amplitud compleja del frente de onda objeto según la siguiente expresión:

$$O^I = \sum_{m=-N/2}^{N/2} \sum_{n=-N/2}^{N/2} I_{mn}^I \exp[ik_{mn}]$$

donde I_{mn}^I es la intensidad del píxel correspondiente a la posición m,n dentro de la subregión I y k_{mn} el vector de dirección de la onda plana que se corresponde con el píxel situado en la posición m,n .

- 5 De acuerdo a un ejemplo de realización, la entidad computacional está configurada para transferir la información contenida por cada píxel a una base de ondas planas en la que cada posición del píxel representa una dirección de propagación del frente de onda objeto, y, ventajosamente, para llevar a cabo la mencionada reconstrucción computacional sumando, para cada subregión del espacio traspuesto, la contribución de
- 10 las distintas componentes angulares expresadas en la base de ondas planas, para proporcionar una imagen de escala de grises, donde el nivel de gris resultante representa una medida cuantitativa del frente de onda objeto.

Para un ejemplo de realización, la entidad computacional está conectada operativamente con una fuente de luz extensa incoherente y con el sensor de imagen para controlarlos a

15 ambos, y está configurada para realizar un proceso de calibrado previo (es decir antes de proceder a realizar las medidas cuantitativas de una muestra), para la caracterización y parametrización del espacio de captura, según la siguiente secuencia:

- controlando a la fuente extensa incoherente para iluminar el espacio objeto de forma que todas las lentes de la disposición bidimensional ordenada de lentes queden

20 iluminadas,

- controlando al sensor de imagen para adquirir, bajo dicha iluminación extensa incoherente, una imagen de la muestra, y

- aplicando un algoritmo de procesamiento de imagen de detección de círculos para proporcionar los siguientes parámetros: posición relativa y tamaño de las lentes de la

25 disposición bidimensional ordenada de lentes y número de píxeles contenido dentro de las subregiones delimitadas por cada lente de la disposición bidimensional ordenada de lentes.

Según un ejemplo de realización, la entidad computacional está configurada para realizar la citada parametrización del espacio de captura, determinando y otorgando las

30 dimensiones angulares al espacio de captura mediante los parámetros obtenidos durante el proceso de calibrado, y en función del tamaño de píxel del sensor de imagen, el cual es conocido por la entidad computacional.

La presente invención también concierne, en un segundo aspecto, a un método para la reconstrucción computacional del frente de onda, que comprende realizar las funciones para las cuales la entidad computacional del microscopio del primer aspecto de la invención está configurada, para cualquiera de sus ejemplos de realización.

- 5 En un tercer aspecto, la presente invención concierne a un programa de ordenador para la reconstrucción computacional del frente de onda, que incluye instrucciones de programa que cuando se ejecutan en un procesador implementan el método del segundo aspecto.

- 10 En un cuarto aspecto, la presente invención concierne a un producto de programa de ordenador que comprende un medio tangible en el que se encuentra almacenado el programa de ordenador del tercer aspecto.

El microscopio de la presente invención, debido a las condiciones del mismo, cuya naturaleza y efectos se describirás a continuación, permite obtener los resultados inalcanzables con la tecnología Hartmann-Shack indicados arriba.

- 15 Por un lado, el número de píxeles de la reconstrucción del frente de ondas del microscopio de la presente invención puede ser significativamente mayor al de un H-S ya que no está ligado al tamaño de las lentes (en este caso el tamaño de las lentes de la disposición bidimensional ordenada es preferentemente del orden del mm , razón por la que se denominarán mililentes). En el microscopio de la presente invención, el número
20 de píxeles de la reconstrucción del frente de onda se obtiene de dividir el número de píxeles del sensor entre el número de mililentes. Si, por ejemplo, para un ejemplo de realización, el microscopio de la presente invención constase de 5 mililentes en una dirección transversal (por ejemplo la horizontal o dirección x) y un sensor de 2.500 píxeles en dicha dirección, la reconstrucción final tendría 500 píxeles en dicha dirección. Si se
25 quisiese tener un sensor H-S con el mismo número píxeles, para un tamaño típico de sensor de unos $6.0 \times 6.0 \text{ mm}$, sería necesario tener microlentes de $d = 12 \mu m$. Como se explicó en el apartado anterior, dicho tamaño se encuentra muy lejos del límite práctico.

- Hay que tener en cuenta que en el microscopio de la presente invención la resolución espacial viene dada por la relación de transposición. Para el caso de un microscopio de
30 aumento moderado, por ejemplo $M_{mic} = 10$ (los microscopios científicos operan con aumentos de hasta $M_{mic} = 100$), la resolución espacial del sistema si se considera un tamaño de píxel de $\Delta x = 6 \mu m$ sería de $0,6 \mu m$. Es decir, dicho sistema mejora la resolución espacial en 3 órdenes de magnitud con respecto a un sensor H-S típico (cuya

resolución, recordemos la determina el tamaño de las microlentes, y por tanto es del orden de 100 a 150 μm).

Por otro lado, el máximo ángulo de las ondas planas muestreable por el microscopio de la presente invención viene dado por

$$5 \quad \sin \theta_{max} = N \frac{p_{\mu}}{2f_{ob}}$$

donde N es el número de mililentes en la correspondiente dirección de muestreo, p_{μ} es el tamaño de las mililentes, y $f_{ob}(mm) = 200/M_{mic}$. Considerando valores típicos, por ejemplo $p_{\mu} = 1mm$, $f_{ob} = 12mm$ y $N = 5$, el ángulo máximo que se podría muestrear sería de $\theta_{max} = 15^{\circ}$. Por tanto, el microscopio de la presente invención permite medir,
10 para las ondas localmente planas que componen el frente de ondas, inclinaciones entre 15 y 30 veces mayores que un H-S.

La presente invención representa una solución compacta y de bajo coste para la medición del frente de onda dispersado por muestras microscópicas. Representa un sistema mucho más estable y sencillo que aquellos basados en la detección interferencial al
15 tiempo que mejora notablemente la resolución espacial con respecto a sistemas basados en detectores Hartmann-Shack.

Debido a que requiere la incorporación de pocos elementos ópticos con respecto a un microscopio convencional, su desarrollo en forma de módulo adaptable a un microscopio comercial es relativamente sencillo.

20 Se propone, por tanto, en un quinto aspecto, tal módulo, el cual incluye al menos la disposición bidimensional ordenada de lentes y el sensor de imagen del microscopio del primer aspecto de la presente invención, así como un soporte de los mismos y un tubo de acople óptico-mecánico adaptado para acoplarse (óptica y mecánicamente) a un puerto de cámara de un microscopio.

25 Un sexto aspecto de la presente invención concierne a un conjunto para microscopio que comprende el módulo para microscopio del quinto aspecto y un módulo de iluminación que comprende a los medios de iluminación del microscopio del primer aspecto de la presente invención adaptados para acoplarse a un puerto de iluminación de un microscopio.

30 La presente invención tiene una aplicación potencial en diversos campos de la ciencia y la tecnología. Por un lado, representa una aplicación directa en cualquier campo que requiera información cuantitativa de muestras microscópicas de forma no invasiva, es

- decir, sin requerir un tinte para observar las distintas estructuras que componen la muestra. Por ello, es de especial interés su uso en histología. Del mismo modo, es posible aplicar la presente invención en metrología y en el estudio de sistemas MEMS (sistemas microelectromecánicos), en especial, el comportamiento de dichos sistemas en función de la temperatura dada a la estabilidad del sistema de medida propuesto con respecto a ésta.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Las anteriores y otras ventajas y características se comprenderán más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada de unos ejemplos de realización con referencia a los dibujos adjuntos, que deben tomarse a título ilustrativo y no limitativo, en los que:

La Figura 1 muestra un esquema del microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención, para un ejemplo de realización.

- 15 La Figura 2 muestra la disposición de la matriz o disposición bidimensional ordenada de lentes del microscopio propuesto por el primer aspecto de la invención, superpuesta sobre la pupila del objetivo del mismo.

- La Figura 3 es una ilustración esquemática de la relación de trasposición entre el espacio de captura y el espacio de reconstrucción, llevada a cabo por la entidad computacional del microscopio del primer aspecto de la presente invención, para un ejemplo de realización del mismo y del método del segundo aspecto de la invención.
- 20

La Figura 4 muestra una serie de imágenes a modo de ejemplo de un experimento de prueba de concepto de utilización del microscopio del primer aspecto de la invención para la reconstrucción computacional de una muestra formada por unas fibras de algodón.

- 25 La Figura 5 es una representación esquemática de la captura, transposición y reconstrucción llevadas a cabo con el microscopio del primer aspecto de la presente invención y según el método del segundo aspecto de la invención, para un ejemplo de realización.

- La Figura 6 muestra un diagrama de flujo con las etapas operativas a seguir mediante el microscopio y método propuestos por la presente invención, para un ejemplo de realización.
- 30

La Figura 7 ilustra de manera esquemática al conjunto para microscopio propuesto por el sexto aspecto de la presente invención con dos acoples, uno al puerto de cámara, para el módulo del quinto aspecto de la invención, y otro al puerto de iluminación, para los medios de iluminación de un módulo de iluminación del conjunto, de un microscopio convencional.

Descripción detallada de unos ejemplos de realización

Según se ilustra en la Figura 1 de manera esquemática, para su realización más básica, el microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención comprende:

- medios de iluminación formados por una fuente de luz 1, parcial o totalmente coherente, para iluminar una muestra T (ilustrada de manera esquemática en la Figura 5);
 - un objetivo de microscopio 2 configurado y dispuesto para recibir y enfocar luz dispersada por la muestra T al ser iluminada con los medios de iluminación 1;
 - una disposición bidimensional ordenada de lentes 3 situada en el diafragma de apertura del objetivo de microscopio 2 o en la ubicación de una imagen intermedia del mismo;
 - un sensor de imagen 4, o sensor pixelado, formado por una pluralidad de elementos fotodetectores o píxeles, que está situado en un espacio de captura sobre el plano focal de la disposición bidimensional ordenada de lentes o matriz de lentes 3 para recibir la luz dispersada por la muestra T tras atravesar el objetivo de microscopio 2 y la disposición bidimensional ordenada de lentes 3, y adquirir información espacial e información angular del frente de onda objeto asociado a la luz proveniente de la muestra T, quedando enfrentados a cada lente varios de los elementos fotodetectores; y
 - al menos una entidad computacional (no ilustrada) conectada operativamente con el sensor de imagen 4 y que está configurada y dispuesta para realizar una reconstrucción computacional del frente de onda objeto a partir de las informaciones espacial y angular.
- Tal y como se ha indicado en un apartado anterior, el espaciado p_{μ} entre los centros de cada dos lentes contiguas de la disposición bidimensional ordenada de lentes 3 es preferentemente de o en torno a 1000 μm , y su apertura relativa tiene un valor de o alrededor de 6.

En la Figura 2 se ilustra la disposición de la matriz o disposición bidimensional ordenada de lentes 3 del microscopio propuesto por el primer aspecto de la invención, superpuesta sobre la pupila del objetivo del mismo. Cada mililente está caracterizada por la posición de su centro con respecto al origen de coordenadas.

La configuración ideal del microscopio cumple las siguientes condiciones (otras configuraciones pueden ser empleadas siempre que se tengan en cuenta las debidas alteraciones producidas en la amplitud compleja del campo al atravesar los componentes del microscopio):

- 5 1) La posición de la matriz de mililentes 3 se corresponde con la posición del diafragma de apertura del objetivo de microscopio 2 o bien con la de cualquier imagen intermedia del mismo.
 - 2) La geometría en la cual se disponen las lentes en la matriz 3 determina el factor de llenado en el diafragma de apertura. La dos geometrías más comunes en que se disponen
10 las mililentes son en matriz cuadrada (los centros de las mililentes se sitúan en los nodos de una red cuadrada bidimensional) o en red hexagonal. Sin embargo, cualquier otra geometría es también válida siempre que las posiciones de los nodos de la red sean conocidas.
 - 3) La fuente de luz 1 proporciona un haz uniforme y colimado (o al menos de baja divergencia) sobre la muestra microscópica T. El ancho del haz B (ver Figura 5) es tal
15 que, en ausencia de muestra, la imagen registrada por el sensor presenta un campo uniforme en la zona correspondiente al plano imagen de la mililente central y ausencia total de luz en el resto, sin que exista solapamiento entre las áreas correspondientes a distintas mililentes.
 - 20 4) El sensor pixelado 4 se sitúa sobre el plano focal imagen de la matriz de mililentes 3.
- Bajo estas condiciones, la información capturada por el microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención representa un proceso de doble muestreo en dos espacios recíprocos, conteniendo así información espacial y angular de forma simultánea. La existencia de una relación de transformación de Fourier entre la
25 información espacial y la angular, da lugar a la siguiente restricción sobre el tamaño del píxel:

$$\Delta x \leq \frac{\lambda f_{\mu}}{p_{\mu}}$$

- donde Δx es el tamaño del píxel, λ la longitud de onda del haz de iluminación con el que los medios de iluminación 1 iluminan la muestra T, f_{μ} la distancia focal de las mililentes y
30 p_{μ} el espaciado entre los centros o nodos de cada dos mililentes contiguas de la matriz 3.

La distribución de intensidades del campo detectado por el sensor se puede expresar matemáticamente como:

$$I(l) = \left| \text{rect} \left(\frac{l \Delta x}{L \cdot \Delta x} \right) \frac{1}{p_\mu} \exp \left(\frac{j\pi}{\lambda f_\mu} (l \Delta x)^2 \right) \left\{ o \left(\frac{l \Delta x}{M} \right) \otimes h \left(\frac{l \Delta x}{\lambda f_\mu} \right) \otimes \left[h_\mu \left(\frac{l \Delta x}{\lambda f_\mu} \right) \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta \left(l \Delta x - n \frac{\lambda f_\mu}{p_\mu} \right) \right] \right\} \right|^2$$

En esta ecuación, l representa el píxel l -ésimo del sensor, la función $h(\cdot)$ representa la
 5 respuesta impulsional 2D del objetivo de microscopio (típicamente un disco de Airy) y
 $h_\mu(\cdot)$ la de la matriz de mililentes (típicamente una matriz de discos de Airy, en el caso de
 mililentes con abertura circular). Estas respuestas impulsionales están determinadas por
 la difracción de ondas y funcionalmente son proporcionales a la transformada de Fourier
 de la apertura correspondiente. Además, la función $o(\cdot)$ representa la distribución de
 10 amplitudes del frente de ondas a medir, $M = -f_\mu/f_{ob}$ y f_{ob} el aumento lateral del microscopio,
 f_{ob} la distancia focal del objetivo de microscopio, y L el número de píxeles del sensor. Por
 último la función $\text{rect}(\cdot)$ es una función binaria que vale 1 en el interior de un rectángulo y
 0 fuera del mismo, y $\delta(\cdot)$ la función delta de Dirac.

Esta expresión pone de manifiesto la existencia en el microscopio y método de la
 15 presente invención, de un doble muestreo de la distribución compleja de amplitudes del
 objeto, $o(\cdot)$, limitada en resolución por la difracción como cualquier sistema óptico libre de
 aberraciones.

En combinación con la particular configuración y disposición de los componentes del
 microscopio del primer aspecto de la presente invención, y con base a los mismos, se
 20 propone un nuevo software de reconstrucción, a implementar por la entidad
 computacional y por el método del segundo aspecto de la invención, cuya primera tarea
 consiste en detectar las posiciones de las imágenes proporcionadas por la matriz de
 mililentes 3 en el plano del sensor de imagen 4. Estas posiciones definen distintas
 regiones del contenido frecuencial que compone el espectro del objeto. El espaciado
 25 entre mililentes define la periodicidad del muestreo de frecuencial.

Por otro lado, el sensor pixelado realiza un segundo muestreo pero ahora sobre el
 contenido espacial. Dado que este muestreo y el anterior se realizan en espacios
 recíprocos, es posible realizar una trasposición, debidamente escalada, de cualquiera de
 ellos para situar ambas informaciones en el mismo espacio. Dicha trasposición puede
 30 entenderse de la siguiente forma:

- El sensor muestrea con periodicidad Δx la información espacial. Sin embargo, dicho muestreo se realiza sobre un campo previamente muestreado por la matriz de mililentes 3 en su espacio recíproco, con una periodicidad p_μ . El producto resolución espacial x ancho de banda (también conocido en la literatura científica como *space-bandwidth product* (SBP)) determina la cantidad de información capturada por un sistema óptico. En la presente invención, la matriz de mililentes 3 es el elemento limitante, por tanto el SBP viene dado por $N \cdot p_\mu$, siendo N el número total de mililentes que caben dentro de la pupila del objetivo y que por tanto proporcionan imágenes sobre el sensor de imagen 4.

- La transposición de la información espacio-angular capturada con el microscopio propuesto da lugar a una nueva expresión de esta información en la que se produce un intercambio de periodicidad de los muestreos, de forma que la nueva matriz pixelada representa un muestreo local de ondas planas del frente de onda dispersado por el objeto. Ahora el periodo del muestreo espacial es $\Delta x/M$ y el del muestreo angular es p_μ/f_{ob} .

De esta forma, se define el que se denominará espacio de reconstrucción E_r (cuyo espacio traspuesto es el de captura) el cual se sitúa virtualmente sobre el espacio objeto o de captura E_c (ver Figuras 3 y 5). Éste consta de L/N regiones, cuya posición viene dada por la periodicidad del nuevo muestreo espacial. Dentro de cada región, se muestrea un total de N ángulos con una precisión que depende de la periodicidad del muestreo angular en el espacio de reconstrucción E_r , según se ilustra en la Figura 3, donde se ilustra la relación de trasposición entre el espacio de captura E_c y el espacio de reconstrucción E_r .

Dicho espacio puede interpretarse como un sistema de captura sintético en el cual se colocan unas microlentes de espaciado $\Delta x/M$ directamente sobre el plano en el cual se encuentra la muestra. Con esto, para cada posición de muestreo espacial, l , el frente de onda objeto $o(x)$ se muestrea localmente, de forma que la intensidad de cada píxel I_{lm} representa una medida de la composición angular del frente de onda objeto. Si se interpreta el frente de ondas objeto como una superposición de ondas planas, la suma de las medidas locales para cada región de muestreo espacial l , debidamente escaladas con la intensidad y la componente angular correspondiente, representa una versión muestreada de dicho frente de onda:

$$O_l = \sum_{n=-N/2}^{N/2} I_{lm} \exp \left[i 2 \pi \left(\frac{p_\mu}{f_{ob}} \right) m \right]$$

Para un objetivo de microscopio dado, la precisión en la medida de las componentes angulares del frente de onda depende del tamaño y número de mililentes en el espacio de captura.

5 A continuación se explica más detalladamente, con referencia a la Figura 5, el proceso de captura, transposición y reconstrucción llevado a cabo con el microscopio del primer aspecto de la presente invención y según el método del segundo aspecto de la invención, para un ejemplo de realización, para un haz de iluminación B con el que se ilumina una muestra T tras la cual se encuentran dispuestas, en el espacio de captura Ec, la matriz de lentes 3 y el sensor de imagen 4, ilustrándose esquemáticamente una representación
10 del espacio de reproducción Er.

Es posible considerar que cada subregión Sr del espacio traspuesto o de reconstrucción Er realiza un muestreo local en ondas planas del frente de onda objeto. Cada píxel de una subregión Sr del espacio traspuesto Er se corresponde con una dirección de propagación de las ondas planas que componen el frente de onda objeto en dicha zona.
15 Se puede considerar que para una subregión dada Sr, denotada por el superíndice l, la amplitud compleja del frente de onda objeto viene dada por:

$$O^l = \sum_{m=-N/2}^{N/2} \sum_{n=-N/2}^{N/2} I_{mn}^l \exp[ik_{mn}]$$

siendo I_{mn}^l la intensidad del píxel correspondiente a la posición m,n dentro de la subregión Sr y k_{mn} el vector de dirección de la onda plana que se corresponde con el píxel situado
20 en la posición m,n.

Por ejemplo, al iluminar una muestra T completamente transparente, tal como muestra la figura, el frente de onda será completamente plano y el registro en el espacio de captura Ec será exclusivamente el campo dado por la mili lente central. Al realizar la transposición, cada subregión Sr tendrá únicamente una componente, dada por el
25 elemento k_{00} . Dicho elemento corresponde a una onda plana viajando en la dirección del eje óptico. De esta forma, a partir de todas las subregiones Sr, se compondría un frente de onda totalmente plano, que es el correspondiente a la muestra T. Dichos elementos se relacionan físicamente con ondas planas a través de los parámetros del sistema de la siguiente forma:

30

$$k_{mn} = \exp\left(i2\pi\left[m\left(\frac{p_\mu}{f_{ob}}\right) + n\left(\frac{p_\mu}{f_{ob}}\right)\right]\right)$$

En la Figura 4 se muestra un resultado preliminar como ejemplo del funcionamiento del microscopio y método de la presente invención. Dicho resultado se obtuvo con un microscopio de baja resolución y no optimizado y con una muestra de fibras de algodón, sin embargo, permite mostrar la potencialidad del concepto presentado en esta invención.

- 5 En el panel de la izquierda de dicha figura se muestra la captura obtenida mediante un microscopio como el que propone la invención. Tras realizar la transposición se obtiene una matriz que representa el espacio de reconstrucción E_r (panel central de la Figura 4). Por último, a partir del procesado de las contribuciones locales al frente de onda dada por los píxeles de las subregiones, se obtiene el frente de onda objeto (Figura 4 panel de
10 la derecha).

- En la Figura 6 se muestra un diagrama de flujo que muestra las etapas del método propuesto por el segundo aspecto de la presente invención, o dicho de otro modo, las funciones para las cuales la entidad computacional del microscopio del primer aspecto de la invención está configurada, para un ejemplo de realización, las cuales se describen
15 a continuación en correspondencia con las leyendas incluidas en cada bloque.

CAPTURA: Captura obtenida por el sensor pixelado 4.

- CALIBRADO: El calibrado es un proceso necesario en la caracterización y parametrización del espacio de captura E_c . Para un mismo montaje, este proceso será necesario realizarlo una única vez. Para ello, el espacio objeto se ilumina con una fuente
20 extensa incoherente, de forma que todas las lentes de la matriz 3 queden iluminadas. Hecho esto, se guarda la imagen obtenida y se aplica un algoritmo de procesado de imagen de detección de círculos. Dicho algoritmo proporciona todos los parámetros necesarios: posición relativa y tamaño de las lentes así como el número de píxeles contenido dentro de las subregiones delimitadas por cada lente.

- 25 PARAMETRIZACIÓN DEL ESPACIO DE CAPTURA: Mediante los parámetros obtenidos durante el calibrado, y conocido el tamaño de píxel del sensor 4, se le otorgan las debidas dimensiones angulares al espacio de captura E_c .

- TRASPOSICIÓN AL ESPACIO DE RECONSTRUCCIÓN: Se aplica una transposición al espacio de captura E_c , empleando los datos de la parametrización. Con ellos, se obtiene
30 un espacio de reconstrucción E_r formado por una serie de subregiones S_r en las que cada píxel representa una dirección angular de propagación del frente de onda.

MEDIDA DE LAS COMPONENTES ANGULARES PARA CADA SUBREGIÓN: La información contenida por cada píxel se transfiere a una base de ondas planas en la que cada posición del píxel representa una dirección de propagación del frente de ondas.

RECONSTRUCCIÓN DEL FRENTE DE ONDAS: Para cada subregión, se suma la contribución de las distintas componentes angulares expresadas en una base de ondas planas. El nivel de gris resultante representa una medida cuantitativa del frente de ondas.

Finalmente, en la Figura 7 se ilustra de manera esquemática al conjunto para microscopio
5 propuesto por el sexto aspecto de la presente invención, que incluye al módulo del quinto aspecto acoplado al puerto de cámara de un microscopio comercial que incluye unos respectivos ocular Oc, objetivo Ob, lente de tubo Z y espejo abatible R, así como a un módulo de iluminación que incluye a unos medios de iluminación acoplados al puerto de iluminación del microscopio.

- 10 El conjunto adaptable a un microscopio comercial consta de dos partes señaladas en el esquema de la Figura 7 mediante línea discontinua:

P1) Módulo de iluminación: Se requiere adaptar unos medios de iluminación, en general un láser y un conjunto de lentes que produzcan la iluminación descrita en el presente documento al puerto de iluminación.

- 15 P2) Módulo del quinto aspecto de la invención, o módulo de colección: La matriz de lentes 3, el sensor 4 y una lente auxiliar 2 (o un conjunto de ellas) se adaptan al puerto de la cámara del microscopio de tal forma que el campo recogido por el sensor 4 tenga las características definidas en la invención.

- 20 La principal ventaja del microscopio propuesto por la presente invención radica en que debido a que la captura física se realiza en el espacio traspuesto, la resolución de las microlentes sintéticas del espacio de reconstrucción E_r no está limitada por la difracción si no por el espaciado entre los píxeles de la cámara o sensor de imagen 4. Este hecho permite proporcionar una medida cuantitativa de fases con una resolución lateral sin precedentes.

- 25 Un experto en la materia podría introducir cambios y modificaciones en los ejemplos de realización descritos sin salirse del alcance de la invención según está definido en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Microscopio para medidas cuantitativas del frente de onda, que comprende:
- medios de iluminación (1) para iluminar una muestra (T);
 - un objetivo de microscopio (2) configurado y dispuesto para recibir y enfocar luz dispersada por la muestra (T) al ser iluminada con dichos medios de iluminación (1);
 - una disposición bidimensional ordenada de lentes (3) situada en el diafragma de apertura de dicho objetivo de microscopio (2) o en la ubicación de una imagen intermedia del mismo;
 - un sensor de imagen (4) formado por una pluralidad de elementos fotodetectores, que está situado en un espacio de captura (E_c) sobre el plano focal de la disposición bidimensional ordenada de lentes (3) para recibir dicha luz dispersada por la muestra (T) tras atravesar dicho objetivo de microscopio (2) y dicha disposición bidimensional ordenada de lentes (3), y adquirir información espacial e información angular del frente de onda objeto asociado a dicha luz proveniente de dicha muestra (T), quedando enfrentados a cada lente varios de dichos elementos fotodetectores; y
 - al menos una entidad computacional conectada operativamente con dicho sensor de imagen (4) y que está configurada y dispuesta para realizar una reconstrucción computacional de dicho frente de onda objeto a partir de dichas informaciones espacial y angular;
- estando el microscopio **caracterizado** porque el espaciado p_μ entre los centros de cada dos lentes contiguas de dicha disposición bidimensional ordenada de lentes (3) es superior a 500 μm y porque su apertura relativa es inferior a 10.
- 2.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el espaciado entre los centros de cada dos lentes contiguas de dicha disposición bidimensional ordenada de lentes (3) tiene un valor que está entre 900 μm y 1100 μm , y su apertura relativa tiene un valor que está entre 5 y 7.
- 3.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el espaciado entre los centros de cada dos lentes contiguas de dicha disposición bidimensional ordenada de lentes (3) tiene un valor entre 990 μm y 1010 μm , preferentemente 1000 μm , y su apertura relativa tiene un valor que está entre 5,8 y 6,2, preferentemente 6.

- 4.- Microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos medios de iluminación luz están configurados para iluminar dicha muestra (T) con luz parcial o totalmente coherente.
- 5 5.- Microscopio de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dichos medios de iluminación luz están configurados para iluminar dicha muestra (T) con una haz de luz (B) con un ancho tal que, en ausencia de muestra o para una muestra (T) transparente, el frente de onda objeto será completamente plano y la adquisición en el espacio de captura (Ec) será exclusivamente el campo de luz dado por una lente central de dicha disposición bidimensional ordenada de lentes (3).
- 10 6.- Microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha disposición bidimensional ordenada de lentes (3) sigue una geometría de red hexagonal.
- 7.- Microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha disposición bidimensional ordenada de lentes (3) sigue una geometría de matriz
- 15 cuadrada.
- 8.- Método para la reconstrucción computacional del frente de onda, que comprende realizar las funciones para las cuales la entidad computacional del microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores está configurada.
- 9.- Método de acuerdo con la reivindicación anterior, que comprende realizar, mediante
- 20 dicha entidad computacional, que es al menos una, el siguiente doble muestreo en dos espacios recíprocos:
- un primer muestreo, o muestreo angular, en el espacio en el que se encuentra la disposición bidimensional ordenada de lentes (3) para obtener la información angular del frente de onda objeto, determinándola, la entidad computacional, y con ella su contenido
 - 25 de frecuencias espaciales, en función de la posición o posiciones en el espacio de captura (Ec) en que el sensor de imagen (4) recibe y adquiere dicha luz emitida por la muestra (T) tras atravesar el objetivo de microscopio (2) y la disposición bidimensional ordenada de lentes (3); y
 - un segundo muestreo, o muestreo espacial, en el espacio de captura (Ec) para obtener
 - 30 la información espacial a partir de la intensidad recibida por cada elemento fotodetector, o píxel, del sensor de imagen (4).
- 10.- Método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el tamaño de cada elemento fotodetector, o píxel, de dicho sensor de imagen (4) cumple la siguiente restricción:

$$\Delta x \leq \frac{\lambda f_{\mu}}{p_{\mu}}$$

donde Δx es el tamaño del píxel, λ la longitud de onda del haz de iluminación con el que los medios de iluminación (1) iluminan dicha muestra (T), f_{μ} la distancia focal de las lentes de dicha disposición bidimensional ordenada de lentes (3) y p_{μ} el espaciado entre los centros de cada dos lentes contiguas de dichas lentes.

11.- Método de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende realizar, mediante dicha entidad computacional, que es al menos una, una transposición de uno de dichos dos espacios recíprocos para situar a ambas informaciones, la espacial y la angular, en el mismo espacio, o espacio de reconstrucción (Er), situado virtualmente sobre el espacio objeto, donde dicho espacio de reconstrucción (Er) consta de L/N regiones, donde L es el número de elemento fotodetectores, o píxeles, del sensor de imagen (4) y N es el número de lentes de la disposición bidimensional ordenada de lentes (3), de manera que se realiza un único muestreo local de ondas planas del frente de onda objeto que incluye a dicho muestreo espacial con una periodo de $\Delta x/M$ donde $M = -f_{\mu}/f_{ob}$ y f_{ob} es la distancia focal del objetivo de microscopio (2), y a dicho muestreo angular con un periodo de p_{μ}/f_{ob} .

12.- Método de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende realizar, mediante la entidad computacional, que es al menos una, dicha reconstrucción computacional, interpretando dicho espacio de reconstrucción (Er) como un sistema de captura sintético en el cual se coloca una disposición bidimensional ordenada de lentes de espaciado entre los centros de cada dos lentes contiguas $\Delta x/M$, de manera que para cada posición de muestreo espacial l , el frente de onda objeto $o(x)$ se muestrea localmente, de forma que la intensidad de la luz recibida en cada elemento fotodetector o píxel I_{lm} , representa una medida de la composición angular del frente de onda objeto.

13.- Método de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende realizar, mediante la entidad computacional, que es al menos una, dicha reconstrucción computacional, considerando que en cada subregión del espacio de reconstrucción (Er) se realiza un muestreo local en ondas planas del frente de onda objeto, donde cada píxel de una subregión del espacio de reconstrucción (Er) se corresponde con una dirección de propagación de las ondas planas que componen el frente de onda objeto en dicha zona.

14.- Método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende determinar, mediante la entidad computacional, que es al menos una, para una subregión dada por el superíndice l , la amplitud compleja del frente de onda objeto según la siguiente expresión:

$$O^I = \sum_{m=-N/2}^{N/2} \sum_{n=-N/2}^{N/2} I_{mn}^I \exp[ik_{mn}]$$

donde I_{mn}^I es la intensidad del píxel correspondiente a la posición m,n dentro de la subregión I y k_{mn} el vector de dirección de la onda plana que se corresponde con el píxel situado en la posición m,n .

- 5 15.- Método de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, que comprende transferir, mediante la entidad computacional, que es al menos una, la información contenida por cada píxel a una base de ondas planas en la que cada posición del píxel representa una dirección de propagación del frente de onda objeto.
- 10 16.- Método de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15, que comprende llevar a cabo dicha reconstrucción computacional, mediante la entidad computacional, que es al menos una, sumando, para cada subregión del espacio de reconstrucción (Er), la contribución de las distintas componentes angulares expresadas en dicha base de ondas planas, para proporcionar una imagen de escala de grises, donde el nivel de gris resultante representa una medida cuantitativa del frente de onda objeto.
- 15 17.- Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que comprende utilizar a la entidad computacional, que es al menos una, que está conectada operativamente con una fuente de luz extensa incoherente y con dicho sensor de imagen (4) para controlarlos a ambos, para realizar un proceso de calibrado previo, para la caracterización y parametrización del espacio de captura (Ec), controlando a dicha fuente
 - 20 extensa incoherente para iluminar el espacio objeto de forma que todas las lentes de la disposición bidimensional ordenada de lentes (3) queden iluminadas, controlando a dicho sensor de imagen (4) para adquirir, bajo dicha iluminación extensa incoherente, una imagen de la muestra, y aplicando un algoritmo de procesamiento de imagen de detección de círculos para proporcionar todos los siguientes parámetros: posición relativa y tamaño de
 - 25 las lentes de la disposición bidimensional ordenada de lentes (3) y número de píxeles contenido dentro de las subregiones delimitadas por cada lente de la disposición bidimensional ordenada de lentes (3).
 - 30 18.- Método de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende realizar, mediante la entidad computacional, que es al menos una, dicha parametrización del espacio de captura (Ec), determinando y otorgando las dimensiones angulares al espacio de captura (Ec) mediante los parámetros obtenidos durante el proceso de calibrado, y en función del tamaño de píxel del sensor de imagen (4).

19.- Programa de ordenador para la reconstrucción computacional del frente de onda, que incluye instrucciones de programa que cuando se ejecutan en un procesador implementan el método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 18.

5 20.- Módulo para microscopio, que comprende al menos la disposición bidimensional ordenada de lentes (3) y el sensor de imagen (4) del microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, así como un soporte de los mismos y un tubo de acople óptico-mecánico adaptado para acoplarse a un puerto de cámara de un microscopio.

21.- Conjunto para microscopio, que comprende:

- 10 - el módulo para microscopio de la reivindicación 20; y
- un módulo de iluminación que comprende a los medios de iluminación (1) del microscopio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 adaptados para acoplarse a un puerto de iluminación de un microscopio.

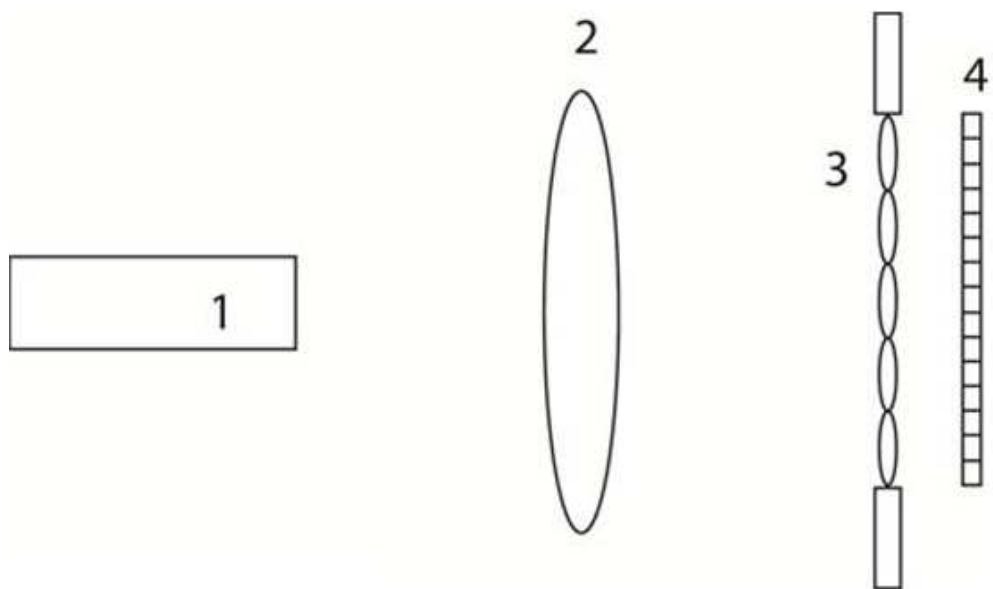


Figura 1

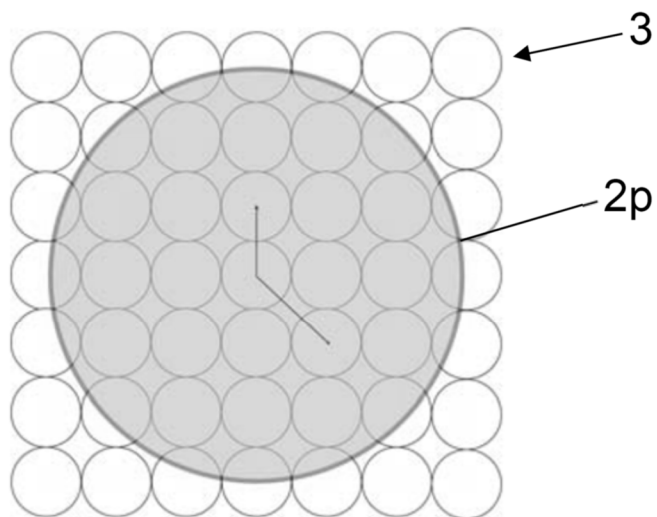


Figura 2

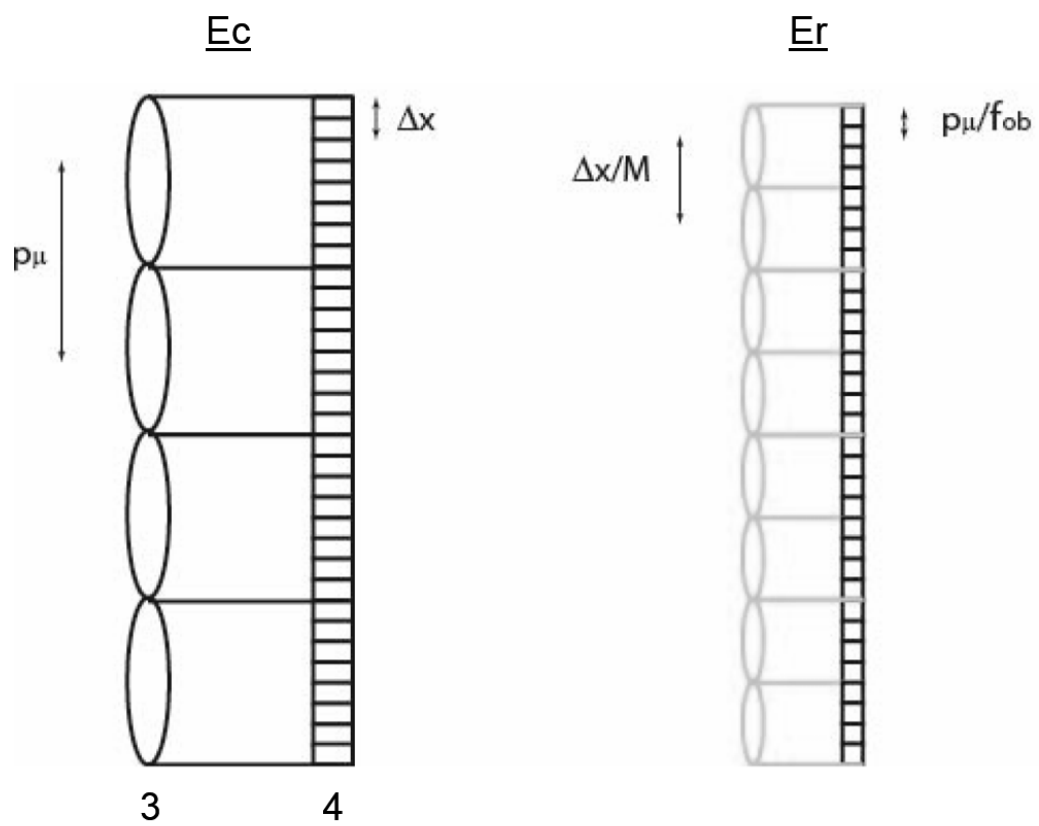


Figura 3

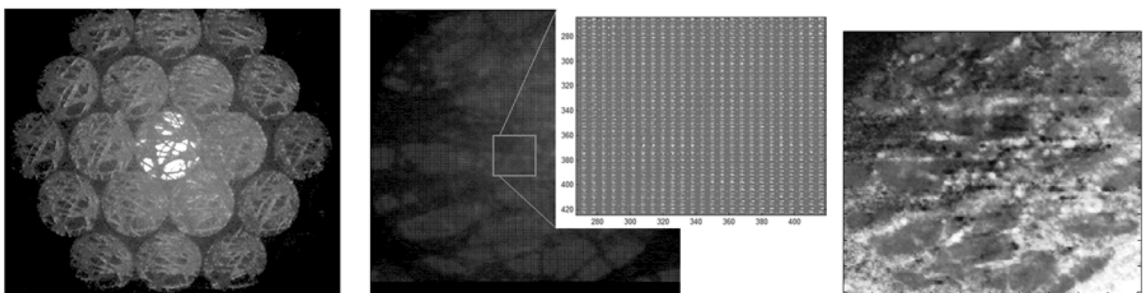


Figura 4

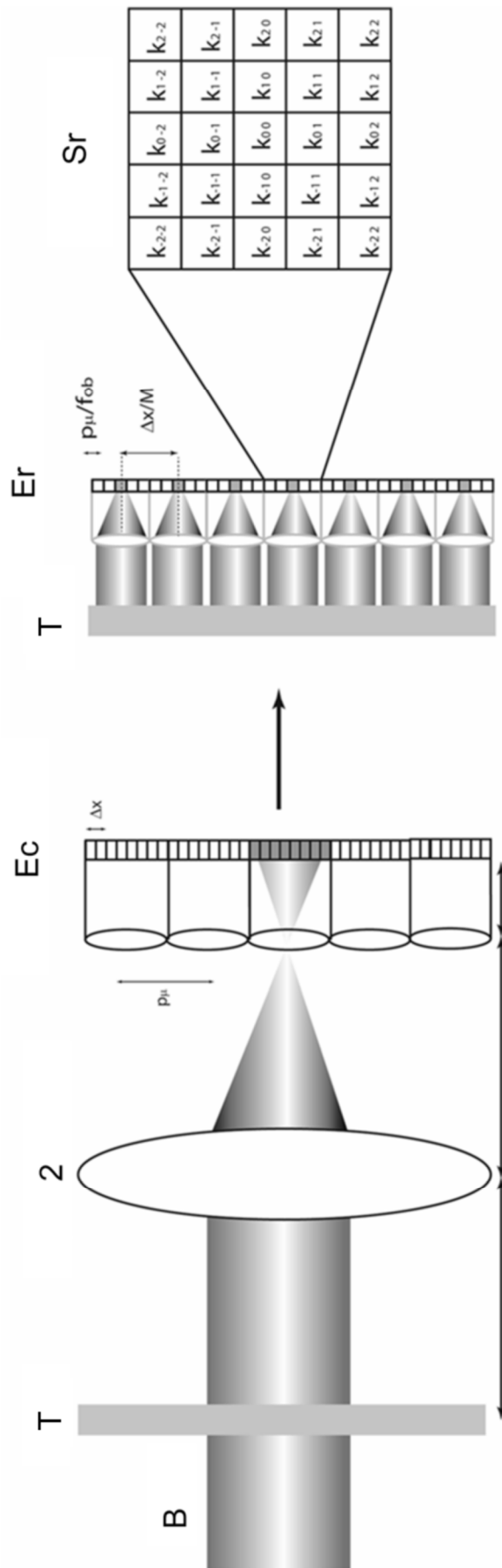


Figura 5

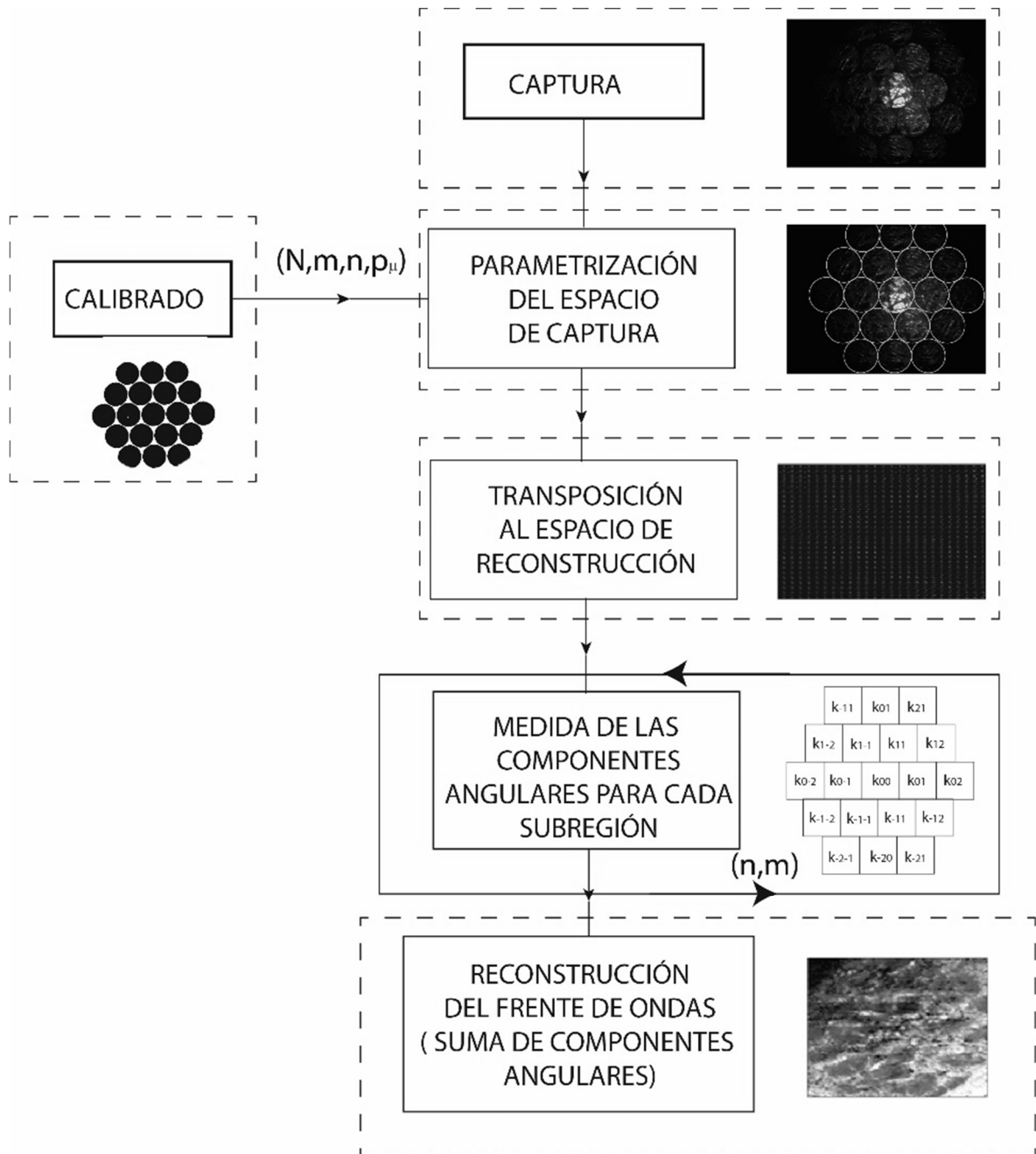


Figura 6

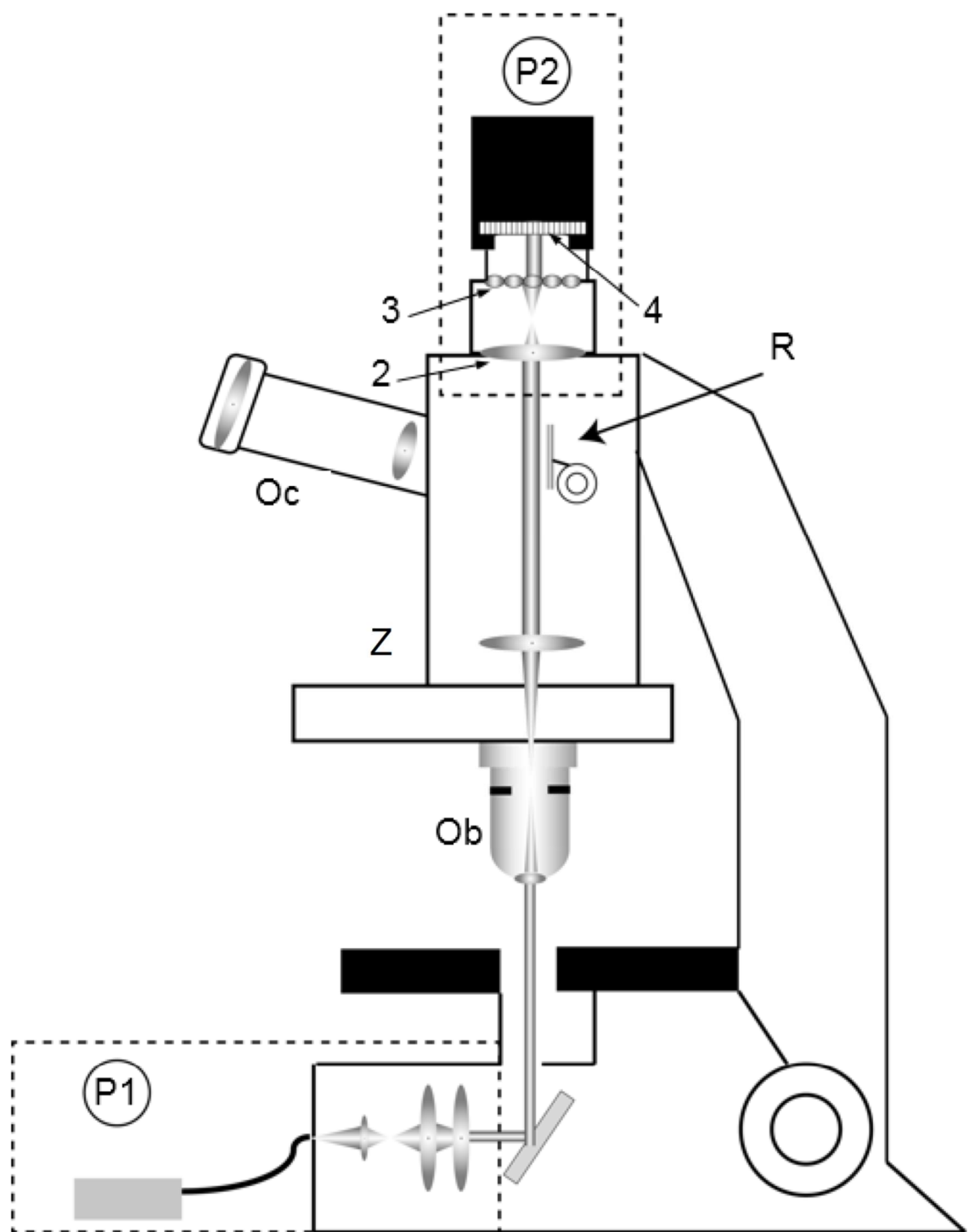


Figura 7