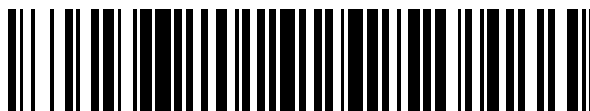


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 014**

51 Int. Cl.:

G03H 1/08 (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)
G03H 1/04 (2006.01)
G03H 1/02 (2006.01)
G03H 1/00 (2006.01)
G01B 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2010** **E 10150524 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016** **EP 2357539**

54 Título: **Interferómetro fuera de eje**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (100.0%)
Avenue Franklin Roosevelt, 50 CP 161
1050 Bruxelles, BE

72 Inventor/es:

DUBOIS, FRANK y
YOURASSOWSKY, CATHERINE

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 589 014 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Interferómetro fuera de eje

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un microscopio holográfico digital fuera de eje.

10 **Estado de la técnica**

[0002] En los interferómetros de la técnica anterior, un haz de luz incidente se suele dividir en un haz del objeto y un haz de referencia que después se recombinan en un plano de registro en el que el haz del objeto y el haz de referencia interfieren y producen franjas de interferencia. El objetivo de dichos dispositivos es la medición de la amplitud compleja de la luz (es decir, información de fase y amplitud).

[0003] Por lo general, la luz que se utiliza en dicha medición posee una alta coherencia, como por ejemplo la luz producida por láseres. Esto presenta varios inconvenientes, como la aparición de ruido coherente (campo de moteado o *speckle*) y el elevado coste relacionado con las fuentes de luz de alta coherencia.

20

[0004] En muchos casos, se introduce un pequeño ángulo entre el haz del objeto y el haz de referencia con el fin de obtener franjas espacialmente heterodinas de baja frecuencia, tal como se describe en el documento US7002691. En general, estos tipos de configuraciones se denominan configuraciones fuera de eje, debido al ángulo no nulo entre el eje del interferómetro y uno de los haces que interfieren.

25

[0005] En dicha configuración fuera de eje, es imprescindible disponer de una luz incidente de alta coherencia para observar interferencia: si las diferencias entre la longitud de la trayectoria del haz de referencia y la del haz del objeto son mayores que la longitud de coherencia del haz incidente, no se puede observar ninguna interferencia y se pierde la información de fase.

30

[0006] Esto quiere decir que, para una luz parcialmente coherente temporalmente, la diferencia en la longitud de la trayectoria en diferentes posiciones del plano de registro introducida por el pequeño ángulo puede bastar para perturbar la coherencia, de manera que solo se observen interferencias en una parte del plano de registro, en la que se mantiene la coherencia.

35

[0007] El registro de información de fase y amplitud (o amplitud compleja) constituye la base de la holografía en general y, más concretamente, de la microscopía holográfica digital (MHD). En la MHD, se registra un holograma con una cámara CCD y un ordenador lleva a cabo la reconstrucción de un modelo tridimensional de la muestra observada. El holograma se obtiene mediante un interferómetro. Este procedimiento proporciona una herramienta eficiente para reenfocar, corte por corte, las imágenes de profundidad de muestras gruesas. La MHD permite obtener una formación de imágenes de contraste de fase cuantitativa con numerosas aplicaciones tales como la observación de muestras biológicas. La capacidad de reconstrucción de profundidad convierte a la MHD en una potente herramienta para la aplicación de la velocimetría 3D. Ya que la holografía proporciona la amplitud compleja, se han aplicado potentes procedimientos de procesamiento, como por ejemplo reenfoque automatizado, compensación de la aberración, reconocimiento de patrones 3D, segmentación y procesamiento de bordes.

45

[0008] El principio de la holografía digital, con la separación del haz del objeto y el haz de referencia, consiste en la extracción de la información compleja de un haz de objeto a partir de los patrones de interferencia registrados entre el haz del objeto y un haz de referencia. La amplitud compleja se puede procesar posteriormente para calcular el reenfoque digital y para llevar a cabo la formación de imágenes de contraste de fase cuantitativa. Existen dos tipos principales de configuración: configuración en línea y configuraciones fuera de eje.

50

[0009] La amplitud compleja se obtiene generalmente mediante un interferómetro, como por ejemplo un interferómetro de tipo Mach-Zehnder o de tipo Michelson.

55

[0010] En configuraciones en línea, tal como describen I. Yamaguchi y col. en «*Phase-shifting digital holography*», *Opt. Lett.* 22, 1268-1270 (1997), el ángulo entre el haz de referencia y el haz del objeto que inciden en el sensor de la cámara es el más pequeño posible. El cálculo de la amplitud compleja requiere un procedimiento de escalonamiento de fase, en el que se registran varias imágenes interferométricas con pequeños cambios en la

trayectoria óptica introducidos entre el haz del objeto y el de referencia. La información de fase óptica se calcula aplicando las imágenes interferométricas en una fórmula.

[0011] La principal desventaja de la configuración en línea radica en la necesidad de registrar secuencialmente varias imágenes interferométricas, que limita la velocidad de adquisición debido a la frecuencia de captura de la cámara. De hecho, el objeto debe permanecer estático durante toda la operación de adquisición, el tiempo que se tarda en registrar varios cuadros.

[0012] En la configuración fuera de eje, tal como se describe en el documento US 6.525.821 y en «*Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry*», de Takeda y col, *J. Opt. Soc. Am.* 72, 156-160 (1982), existe un ángulo medio no nulo entre el haz del objeto y el de referencia que permite el cálculo de la amplitud compleja a partir de una única imagen interferométrica registrada. Respecto a la configuración en línea, esto supone una ventaja decisiva para el análisis de fenómenos que varían rápidamente. Sin embargo, la utilización de un interferómetro de tipo Mach-Zehnder o de tipo Michaelson en esas configuraciones requiere una fuente óptica de una alta coherencia temporal. De lo contrario, la modulación de franjas no es constante debido a los retardos ópticos variables a lo largo del campo de visión entre el haz del objeto y el de referencia.

[0013] Tal como describen Dubois y col. en «*Improved three-dimensional imaging with digital holography microscope using a partial spatial coherent source*», *Appl. Opt.* 38, 7085-7094 (1999), y en «*Application of digital holographic microscopes with partially spatial coherence sources*» en *J. of Phys.: Conf. Series* 139 (2008), el empleo de iluminación parcialmente coherente mejora la calidad del registro holográfico al disminuir los artefactos y ruidos coherentes. En la transmisión, la reducción de ruido más eficaz se obtiene mediante una iluminación parcialmente coherente espacialmente. Este tipo de iluminación se obtiene reduciendo las propiedades de coherencia de un haz láser o aumentando la coherencia espacial de una fuente incoherente, como un diodo emisor de luz (LED), por medio de un sistema de filtrado óptico.

[0014] Con la disposición que se emplea habitualmente para reducir la coherencia espacial de un láser, el haz láser se enfoca cerca de un vidrio deslustrado en movimiento. Para una posición dada del vidrio deslustrado, la luz transmitida a través de la muestra constituye un campo de moteado. Cuando el vidrio deslustrado está en movimiento, y suponiendo que el tiempo de exposición es lo suficientemente largo como para obtener un efecto promediador, se puede demostrar que este tipo de fuente es equivalente a una fuente luminica parcialmente coherente espacialmente cuya distancia de coherencia espacial es igual al campo de moteado promedio. Este procedimiento para preparar la fuente mantiene un alto grado de coherencia temporal que posibilita el procedimiento fuera de eje. Sin embargo, cuando se requieren tiempos de exposición cortos surgen fluctuaciones en la iluminación. En la práctica, es difícil lograr que un vidrio deslustrado se mueva lo suficientemente rápido para registrar un objeto dinámico que requiere un tiempo de exposición corto.

[0015] Con la disposición que aumenta la coherencia espacial de una fuente incoherente o fuente no láser, se mantienen las propiedades de incoherencia temporal. En tal caso, no se puede aplicar la configuración fuera de eje ni registrar toda la información de amplitud compleja en un único cuadro.

[0016] En lo que respecta a la colocación de las muestras, se pueden definir dos tipos de configuraciones principales: configuración diferencial, tal como se describe en el documento EP 1631788, en el que la muestra está situada frente al interferómetro, y la configuración clásica que se define en el documento EP 1399730, en el que la muestra está situada en un brazo del interferómetro.

Objetivos de la invención

[0017] La presente invención tiene como objetivo proporcionar un interferómetro que supere los inconvenientes de los interferómetros de la técnica anterior.

[0018] Más concretamente, la presente invención tiene como objetivo proporcionar un interferómetro fuera de eje capaz de trabajar con fuentes de luz parcialmente coherente.

[0019] En el documento de patente US3572934, se describe una interferometría de desplazamiento (*shearing*) longitudinalmente invertido, en la que se utiliza una rejilla para dividir un haz de luz coherente en dos haces que interfieren. La fuente de luz que se emplea es coherente tanto temporal como espacialmente (láser).

[0020] En el artículo «*Time resolved digital holography: a versatile tool for femtosecond laser induced damage*

- studies*», (*Laser induced damage in Optical materials*, 2009, *Proc of SPIE* vol. 7504), de A. Melninkaitis y col., se describe un dispositivo de registro holográfico que comprende una rejilla para obtener una interferencia fuera de eje. La disposición utiliza una fuente de luz con una elevada coherencia espacial y no sería capaz de registrar patrones de interferencia homogéneos con una fuente de luz parcialmente coherente espacialmente. En el artículo «*Resolution-enhanced approaches in digital holography*», (*Optical Measurement Systems for Industrial Inspection VI, Proc. of SPIE*, vol. 7389), de M. Paturzo y col., se describe un procedimiento que utiliza una rejilla de fase de difracción dinámica para aumentar sintéticamente la apertura de un sistema holográfico digital de formación de imágenes en una configuración desprovista de lentes.
- 5 [0021] La presente invención también tiene como objetivo proporcionar configuraciones de microscopio holográfico digital (MHD) que permiten utilizar las configuraciones fuera de eje con una fuente con coherencia temporal y/o espacial. De este modo se logra la capacidad de llevar a cabo un rápido registro holográfico digital en color con niveles de ruido muy bajos.
- 15 [0022] La presente invención también tiene como objetivo proporcionar microscopios holográficos digitales que permitan la utilización de fuentes con coherencia parcial creadas a partir de una fuente incoherente con la configuración fuera de eje. Constituye una mejora considerable, ya que permite accionar el microscopio en modo rápido sin la desventaja de las fluctuaciones debidas a la configuración con un láser (ruido coherente). Además, esta aplicación permite utilizar fuentes de bajo coste, como el LED, y ofrece la posibilidad de registrar de manera simultánea
- 20 hologramas en rojo-verde-azul para proporcionar una microscopía holográfica digital totalmente en color sin el ruido coherente.

Resumen de la invención

- 25 [0023] Un primer aspecto de la invención se refiere a un microscopio holográfico digital fuera de eje tal como se expone en la reivindicación independiente 1.
- [0024] La expresión «fuera de eje» quiere decir que al menos uno de los haces de luz interferentes presenta un ángulo no nulo con respecto al eje del interferómetro, o de manera equivalente, que los haces de luz interferentes son
- 30 haces no paralelos.
- [0025] La expresión «dos planos ópticamente conjugados en un sistema óptico» quiere decir que uno de los planos es la imagen óptica del otro.
- 35 [0026] Una rejilla con una periodicidad d divide un haz incidente en varios haces cumpliendo con la condición:

$$d(\sin \theta_m + \sin \theta_i) = m\lambda$$

- en la que θ_m es el ángulo entre el haz de luz difractado y la normal de la rejilla, θ_i es el ángulo entre el haz de luz
- 40 incidente y la normal de la rejilla, λ es la longitud de onda de la luz y m es un número entero denominado «orden de difracción». La luz que corresponde a la transmisión directa (o reflexión especular en el caso de una rejilla de reflexión) se denomina «de orden cero» y se indica « $m = 0$ ». Los otros haces de luz forman ángulos que se representan mediante números enteros m distintos de cero. Obsérvese que m puede ser un valor positivo o negativo, lo que da lugar a órdenes difractados a ambos lados del haz de orden cero.
- 45 [0027] En las reivindicaciones independientes 3 y 4 adjuntas, se exponen otras configuraciones del microscopio holográfico digital fuera de eje de acuerdo con la invención. En las reivindicaciones dependientes adjuntas se exponen otros aspectos de la invención.

50 Descripción breve de los dibujos

[0028]

- La fig. 1 ilustra la limitación de la coherencia entre dos haces interferentes secantes en un plano.
- 55 La fig. 2 representa un interferómetro de acuerdo con la presente invención.
- La fig. 3 representa un microscopio holográfico digital de transmisión que trabaja en modo diferencial y comprende un interferómetro de acuerdo con la presente invención.

La fig. 4 representa un microscopio holográfico digital de transmisión que comprende un interferómetro de acuerdo con la presente invención.

5 La fig. 5 representa un microscopio holográfico digital de reflexión que comprende un interferómetro de acuerdo con la presente invención.

La fig. 6 representa un microscopio holográfico digital de transmisión que trabaja en modo diferencial y comprende un interferómetro de acuerdo con la presente invención.

10

La fig. 7 representa un microscopio holográfico digital de transmisión con capacidad de trabajar con fluorescencia, que comprende un interferómetro de acuerdo con la presente invención.

Referencias de las figuras

15

[0029]

- 1. Primer haz de luz
- 2. Segundo haz de luz
- 3. Tercer haz de luz
- 20 4. Medios de registro
- 5. Haz de luz difractado (difracción de orden distinto de cero)
- 6. Haz de luz paralelo difractado de orden distinto de cero
- 6'. Haz de luz paralelo difractado de orden cero
- 7. Haz de luz no difractado (o difracción de orden cero)
- 25 8. Elemento de parada óptica
- 9. Haz de luz incidente
- 10. Plano de registro
- 11. Medios de compensación para cuña de compensación
- 12. $2 \cdot$ Longitud de coherencia
- 30 13. Área de interferencia
- 14. Plano de coherencia
- 15. Interferómetro
- 16. Espejo de referencia
- 17. Fuente de luz de excitación por fluorescencia
- 35 Bs1, Bs2, Bs3 y Bs4: Divisores de haz
- EF: Filtro de excitación
- G: Rejilla
- L1, L2, L3, L4, L5, L6 y L7: lentes
- M11 y M12: objetivos del microscopio
- 40 M1, M2 y M3: espejos
- P: microorificio en una pantalla
- Sa: Muestra o portamuestras de transmisión
- So: Fuente de iluminación
- RA: Mecanismo giratorio
- 45 Rs: Muestra o portamuestras de reflexión
- W: Cuña

[0030] En interferometría, cuando se usa luz parcialmente coherente, resulta crucial mantener la coherencia de la luz incidente en un plano de registro para observar franjas de interferencia. En muchos casos, las franjas de interferencia se obtienen dividiendo un primer haz de luz (incidente) para generar un segundo y un tercer haz de luz, y recombinando el tercer y el segundo haz de luz con un pequeño ángulo introducido entre ellos.

[0031] En ese caso, la pequeña longitud de coherencia de la luz incidente parcialmente coherente (la luz que se va a analizar) introduce una severa limitación: al no ser paralelos, los planos de coherencia de ambos haces solo pueden interferir en una pequeña área en la intersección entre ambos planos, sin que se observe ninguna interferencia cuando la distancia entre los planos de coherencia es mayor que la longitud de coherencia.

[0032] Esto se ilustra en la fig. 1, en la que un haz de luz perpendicular a un plano interfiere con otro haz de luz no paralelo con un α fuera de eje con respecto al plano. Tal como se representa, la luz no paralela solo es coherente

(capaz de interferir) en la proximidad del plano de coherencia 14, a una distancia menor que la longitud de coherencia 12, que define un área limitada 13 en la que se observa interferencia.

[0033] La presente invención describe un interferómetro en el que el plano de coherencia de un haz de luz interferente no es perpendicular a la dirección de propagación del haz de luz en la proximidad de un plano de registro. Esto proporciona la capacidad del haz de luz no perpendicular para interferir con un haz de luz perpendicular y producir un contraste de franjas que no depende de la posición en el plano de registro. Esto permite el registro de franjas interferentes fuera de eje (franjas espacialmente heterodinas) incluso en el caso de que la luz posea una longitud de coherencia limitada, como es el caso de la luz producida por un LED, una lámpara de descarga de gas, etc.

[0034] Al utilizar como primer haz de luz (incidente) un haz de luz de coherencia temporal parcial, el segundo y el tercer haz de luz en interferómetros de la técnica anterior solo puede interferir en las zonas correspondientes definidas por la longitud de coherencia. Esto significa que la diferencia en la longitud de la trayectoria óptica y el desplazamiento de fase debida a los dispositivos ópticos dispuestos en la trayectoria óptica entre el segundo y el tercer haz de luz debería continuar siendo menor que la longitud de coherencia de la fuente de luz.

[0035] La coherencia temporal es la medida de la correlación media entre los valores de una onda en cualquier par de instantes, separados por un intervalo temporal τ , que caracteriza si una onda puede interferir consigo misma en un instante diferente. El intervalo temporal a lo largo del cual varía la fase o la amplitud en una medida considerable (por tanto, la correlación se reduce en una medida considerable) se define como tiempo de coherencia τ_c . En $\tau = 0$, el grado de coherencia es perfecto, mientras que se reduce considerablemente en el intervalo temporal τ_c . La longitud de coherencia L_c se define como la distancia recorrida por la onda en el tiempo τ_c . Se puede estimar la longitud de coherencia mediante la fórmula:

$$L_c = \frac{2 \ln(2) \lambda^2}{\pi n \Delta\lambda}$$

en la que λ es la longitud de onda de la luz, $\Delta\lambda$ es la amplitud espectral de la fuente y n es el índice refractivo de propagación. Para una típica fuente LED, esto representa desde algunas longitudes de onda hasta algunas decenas de longitudes de onda. Por ejemplo, para un LED con una longitud de onda de 650 nm y un ancho de banda espectral de 15 nm (valores típicos para los LED disponibles en el mercado), la longitud de coherencia es de aproximadamente 20λ . Esto significa que el haz de referencia fuera de eje no puede tener un desplazamiento de fase mayor que el tiempo de coherencia, en ningún lugar del plano de registro. También supone que el número de franjas inducidas por la diferencia angular entre el haz de referencia y el haz del objeto no puede ser superior a aproximadamente 20, lo cual constituye una severa limitación.

[0036] La limitación del tiempo de coherencia también puede deberse a la duración del impulso de un láser de impulsos ultracortos. Normalmente, dicho láser de impulsos posee una duración del impulso de varios femtosegundos, por lo que la longitud del impulso está limitada a alguna longitud de onda. En ese caso, el tiempo de coherencia es igual a la duración del impulso. De nuevo, esto supone que el número de franjas inducidas por la diferencia angular entre el haz de referencia y el haz del objeto no puede ser mayor que el número de longitud de onda que representa la longitud del impulso.

[0037] Preferentemente, para evitar esta limitación en ambos casos, la presente invención aprovecha las propiedades particulares de las rejillas de difracción para producir un haz de referencia fuera de eje sin perturbar la coherencia temporal de los haces interferentes en el plano de registro.

[0038] En el interferómetro 15 de la presente invención, una rejilla de difracción G está situada en el plano focal posterior de una lente L5 situada en los ejes ópticos de un haz de luz incidente 9. La rejilla G provoca la división del haz de luz incidente 9 para generar un haz difractado 5 (referencia) y un haz de luz no difractado 7 (que se convertirá en el haz del objeto). Después, una segunda lente L6 situada a una distancia focal con respecto a la rejilla G modifica la forma del haz difractado y del haz no difractado para formar haces paralelos al eje óptico. L5, L6 y la rejilla G se seleccionan para obtener, detrás de L6, dos haces de luz separados espacialmente, un haz difractado y un haz de luz no difractado. El haz de luz no difractado puede convertirse en el haz del objeto o bien ser eliminado por un elemento de parada óptica. En el último caso, se puede proporcionar otro haz de objeto mediante una estructura óptica más grande, tal como se describirá más adelante. El haz difractado se recombina posteriormente con el haz del objeto y se enfoca por medio de una lente de objetivo L7 en un plano de registro, con el plano de registro situado en el plano focal posterior de L7.

[0039] Al ser el haz difractado paralelo al eje óptico de L7, pero no centrado en este eje óptico, L7 introducirá un ángulo fuera de eje en dicho haz difractado.

5 **[0040]** Otra posibilidad consiste en que los haces de luz interferentes sean cualquier par de haces de luz difractados con un orden de difracción diferente. Por ejemplo, se puede escoger el haz de luz difractado de orden +1 como haz de luz de referencia y se puede escoger el haz de luz difractado simétrico de orden -1 como haz del objeto.

[0041] Preferentemente, se utiliza un elemento de parada óptica para detener todos los haces de luz menos los
10 dos haces difractados seleccionados para interferir en el plano de registro.

[0042] Se puede demostrar que, en dicha configuración, la rejilla no perturba la coherencia temporal de cualquier haz de luz difractado de orden distinto de cero. La coherencia temporal está relacionada con la trayectoria óptica recorrida. Por lo tanto, resulta equivalente a probar que un impulso temporal óptico que ilumina los planos
15 focales posteriores de L5 y L4 en un tiempo dado iluminará simultáneamente la totalidad del plano focal posterior de L7.

[0043] Se considera que una rejilla G, cuya transparencia viene definida por $g(x,y)=(1+\sin Kx)/2$, está iluminada por una onda plana monocromática de amplitud A. Suponiendo que la pareja de lentes L6-L7 constituye un sistema afocal (L6-L7 forman un sistema de tipo 4f), la amplitud en el plano de registro viene dada por:

$$u_v(x, y) = B \exp \left\{ j \frac{4\pi v}{c} (f_6 + f_7) \right\} g \left(-\frac{f_6}{f_7} x, -\frac{f_6}{f_7} y \right) \quad (1)$$

en la que B es una constante que no desempeña un papel relevante, $j = \sqrt{-1}$, v es la frecuencia óptica, c es la
25 velocidad de la luz en el vacío y f_6 y f_7 son las longitudes focales de L6 y L7. Al calcular la contribución de un único haz difractado en el plano de registro, la ecuación (1) se convierte en:

$$u'_v(x, y) = B' \exp \left\{ j \frac{4\pi v}{c} (f_6 + f_7) \right\} \exp \left(-jK \frac{f_6}{f_7} x \right) \quad (2)$$

30 en la que $K = 2\pi/\Lambda$, siendo Λ el periodo espacial de la rejilla. B' es una constante que no desempeña un papel relevante.

[0044] La iluminación mediante un impulso temporal con forma de delta de Dirac se obtiene al llevar a cabo la transformación de Fourier de la ecuación (2):

35
$$u'_t(x, y) = B' \delta \left\{ t - \frac{2}{c} (f_6 + f_7) \right\} \exp \left(-jK \frac{f_6}{f_7} x \right) \quad (2)$$

en la que t es el tiempo, la ecuación (3) expresa el hecho de que un impulso de luz espacialmente uniforme en el plano focal frontal de L6 alcanzará simultáneamente todos los puntos del plano focal posterior de L7 sin intervalo de tiempo dependiendo de la posición (x,y). La parte exponencial expresa el hecho de que el haz incide en el plano del sensor con un ángulo inclinado con respecto al eje óptico. Por lo tanto, cuando se ecualicen las trayectorias ópticas del interferómetro de la presente invención, será posible registrar el patrón de interferencia en la totalidad del plano del sensor entre el haz del objeto y el de referencia. El ángulo inclinado del haz de referencia proporciona la configuración fuera de eje.

45 **[0045]** Debido a que la propiedad demostrada de dicha rejilla no depende del haz de luz no difractado, la disposición descrita, que comprende una rejilla G situada en un plano conjugado con el plano de registro 10, se puede utilizar en cualquier disposición fuera de eje. Esta conjugación se puede obtener, por ejemplo, mediante un sistema de tipo 4f con una rejilla entre las dos lentes L5, L6 y una lente de enfoque L7.

50 **[0046]** En esta etapa, se puede observar que el haz difractado, que ahora tiene su plano de coherencia paralelo al plano de registro, puede interferir con cualquier haz de luz con una trayectoria óptica equivalente y con su plano de coherencia paralelo al plano de registro. Más concretamente, puede interferir con el haz de luz no difractado, pero también con haces de luz difractados de otro orden, o un haz de luz que pase a través de otro brazo de un interferómetro de tipo Mach-Zehnder o de tipo Michaelson de mayor tamaño, siempre que la diferencia en la trayectoria
55 óptica no supere la longitud de coherencia de la luz incidente.

[0047] En el microscopio holográfico digital (MHD) fuera de eje de la presente invención, se registran hologramas digitales mediante fuentes de luz parcialmente coherente. Para obtener dichas fuentes de luz parcialmente coherente, se pueden utilizar fuentes de luz incoherente tales como diodos LED. Para obtener la coherencia parcial necesaria para observar las franjas de interferencia que se requieren para determinar la información de fase de la luz entrante, se puede utilizar un filtro espacial.

[0048] En la fig. 3 se representa un primer ejemplo de un microscopio que hace uso de un interferómetro 15 de acuerdo con la invención. En esta figura, una fuente de luz parcialmente coherente S_0 , como por ejemplo un LED, está situada en el plano focal posterior de una lente L1. Después, el haz de luz producido se filtra espacialmente a través de un microorificio P en una pantalla con el fin de aumentar su coherencia espacial. El microorificio P está situado en el plano focal posterior de una lente L2, para iluminar la muestra Sa. La muestra Sa está situada en el plano focal posterior del objetivo del microscopio ML1 y después sigue al interferómetro 15 tal como se describe anteriormente. El holograma en esta figura se registra por medio de una cámara CCD.

[0049] En este último caso, se inserta preferentemente una cuña W en la trayectoria óptica de uno de entre el segundo o el tercer haz de luz, con el fin de provocar un leve desplazamiento de las imágenes producidas por los haces de luz difractado y no difractado, con el fin de obtener el interferograma diferencial tal como se describe en el documento EP 1631788. En este caso, se introducen preferentemente unos medios de compensación 11 en la trayectoria óptica del haz de luz no difractado para compensar el desplazamiento de fase introducido por la cuña en el haz difractado.

[0050] Otra posibilidad consiste en introducir el interferómetro en una estructura óptica más grande, tal como un interferómetro Mach-Zehnder representado en los MHD ilustrados en las figs. 4 a 7. En dicho caso, el haz de luz no difractado 15 es detenido por un elemento de parada óptica 8 y el haz del objeto se proporciona mediante otra trayectoria óptica, por ejemplo otro brazo de un interferómetro tipo Mach-Zehnder.

[0051] Como ocurre con los microscopios holográficos habituales, un primer haz de luz 1 se divide en un segundo haz de luz 2 y un tercer haz de luz 3 por medio de un primer divisor de haz Bs1, y se recombinan mediante un segundo divisor de haz Bs2 para dar lugar a un haz recombinado, y dichos segundo y tercer haz de luz interfieren en el haz recombinado y forman un patrón de interferencia en un medio de registro, tal como un sensor CCD, con el fin de obtener patrones de interferencia. En dicho caso, el interferómetro 15 de la presente invención se inserta en el brazo de referencia del interferómetro tipo Mach-Zehnder con el fin de obtener la configuración fuera de eje, deteniéndose el haz no difractado 6' mediante un elemento de parada óptica 8.

[0052] Preferentemente, la presencia de las lentes L5 y L6 se compensa mediante las lentes L3 y L4 en la trayectoria del haz del objeto con el fin de compensar la modificación de fase inducida por dichas lentes L5 y L6.

[0053] Preferentemente, la lente L7 se coloca después del divisor de haz Bs2 del interferómetro tipo Mach-Zehnder, utilizado para recombinar el haz del objeto y el de referencia. Esto permite compartir dicha lente L7 entre el haz del objeto y el de referencia.

[0054] Otra posibilidad consiste en sustituir la lente L7 por dos lentes situadas respectivamente en la trayectoria óptica del haz de referencia y en la trayectoria óptica del haz del objeto, con ambas lentes enfocando en los medios de registro, pero situadas antes de los medios de recombinación.

[0055] También se pueden incorporar configuraciones que incluyen una fuente de excitación por fluorescencia, tal como se representa en la fig. 7.

[0056] Debido a que no es necesario utilizar ningún desplazamiento de fase, la MHD descrita se puede usar para registrar escenas dinámicas de gran rapidez, registrando varios cuadros sucesivos con el fin de registrar secuencias temporales de representación 3D de la muestra que se va a observar.

[0057] Esta aplicación permite el uso de fuentes de bajo coste, como los LED, y, con sensores de color, permite el registro simultáneo de hologramas rojo-verde-azul mediante una iluminación con tres LED, a fin de proporcionar una microscopía holográfica digital totalmente en color sin el ruido coherente. Hasta ahora, la aplicación de la microscopía holográfica digital en color requería emplear complejos procedimientos de registro. En la invención descrita, los tres colores se pueden registrar de manera simultánea.

[0058] En el mercado hay varios tipos de sensores de color, incluidos los sensores de un solo color, tales como los diseños de sensor triple y CCD de color. En los diseños de sensor triple, un bloque prismático (es decir, un conjunto tricroico que comprende dos prismas dicróicos) puede filtrar el interferograma obtenido para generar los tres colores primarios, rojo, verde y azul, dirigiendo cada color hacia un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) o sensor de 5 píxeles activos (sensor de imagen CMOS) montado en cada cara del prisma.

[0059] Existen varios tipos de rejillas de transmisión que se pueden aplicar. El tipo de rejilla más sencillo es la rejilla de Ronchi, que está formada por una placa óptica transparente en la que están impresas unas líneas opacas paralelas con una anchura l . Hay un espacio transparente constante L entre las líneas opacas consecutivas. Las rejillas 10 de Ronchi a menudo poseen una anchura de apertura transparente igual a la de la opaca. La cantidad significativa que caracteriza a una rejilla de Ronchi y el ángulo de difracción para una longitud de onda dada es el periodo de la rejilla $P=L+1$. El análisis de difracción de una rejilla de Ronchi se lleva a cabo descomponiendo en primer lugar la función de transmitancia de acuerdo con una serie de Fourier. Para una longitud de onda dada, cada componente de Fourier da lugar a un orden de difracción caracterizado por un ángulo de difracción θ_m , en el que m es un número 15 entero y θ es el primer ángulo de difracción.

[0060] La amplitud difractada en cada orden de difracción es proporcional al correspondiente componente de Fourier. En el interferómetro de la invención 15, el periodo de la rejilla se selecciona de manera que garantice una separación espacial de los haces difractados en el plano, en el que está situada la parada óptica 8.

[0061] Habitualmente, lo que se mantiene es uno de los órdenes de difracción ($m=+1$ o -1) para el haz de referencia que incide en el detector. Una limitación de la rejilla de Ronchi consiste en la dispersión de la intensidad de la luz entre varios órdenes de difracción, con lo que se reduce la luz disponible para las mediciones interferométricas.

[0062] Para optimizar la eficiencia de la difracción en el orden de difracción mantenido para el procedimiento holográfico, se puede aplicar una rejilla de difracción escalonada (*blazed*). Las rejillas de difracción escalonadas también poseen una estructura periódica en una de las superficies de una placa óptica. En este caso, se trata de un relieve en forma de diente de una superficie que optimiza la eficiencia de la difracción en los órdenes de difracción $m=1$ o $m=-1$.

[0063] Para optimizar la eficiencia de la difracción, también es posible incorporar rejillas holográficas de fase gruesas. Este tipo de rejilla se obtiene registrando en un material fotosensible, por ejemplo gelatina dicromada, el patrón de interferencia entre dos ondas planas. Posteriormente, la placa se procesa y es capaz de difractar mayormente la luz en un orden de difracción de acuerdo con un modo de difracción de Bragg. El ángulo entre la onda 35 del plano de registro determina el periodo de la rejilla.

[0064] Después, las salidas analógicas se pueden digitalizar y tratar mediante un ordenador con el fin de obtener una representación tridimensional en color de las muestras.

[0065] Una fuente parcial temporal y espacial puede estar constituida por una fuente (S_0), una lente de colimación (L_1), un microorificio (P) y una lente (L_2). La coherencia temporal se obtiene a partir de la anchura espectral de la fuente (S_0). Normalmente, puede tratarse de un LED con un espectro que presenta un pico (por ejemplo, la longitud de onda $\lambda = 650$ nm, $\Delta\lambda = 15$ nm), o un conjunto de LED que proporcionan un conjunto de picos, para lograr un registro holográfico en color. El haz se colima mediante la lente (L_1) y se filtra por medio del microorificio (P) a fin 45 de aumentar la coherencia espacial. Se puede demostrar que la dependencia de la coherencia espacial emergente, que surge de la lente (L_2), es uniforme y se puede modelizar mediante una función de coherencia $\gamma(x_1 - x_2, y_1 - y_2)$, en la que (x_1, y_1) y (x_2, y_2) son coordenadas espaciales perpendiculares al eje óptico z .

[0066] Esta aplicación de la fuente parcialmente coherente no supone ninguna restricción y se puede llevar a la práctica de maneras diferentes, como por ejemplo con un haz láser descorrelacionado mediante un vidrio deslustrado en movimiento.

Descripción de las realizaciones preferidas de la invención

55 Configuración Mach-Zehnder

[0067] La fig. 4 ilustra el esquema del microscopio holográfico digital basado en una configuración de tipo Mach-Zehnder que permite el registro fuera de eje con fuentes ópticas con coherencia parcial espacial y temporal.

[0068] En el caso de la fig. 4, la fuente de luz está constituida por una fuente (So), una lente de colimación (L1), un microorificio (P) y una lente (L2).

[0069] Tras una reflexión en el espejo M1, el haz es dividido por Bs1 para generar el haz del objeto que ilumina la muestra en la transmisión y el haz de referencia, que se redirige hacia la lente del microscopio ML2. La imagen del plano focal frontal de M1 se lleva a cabo mediante el conjunto de lentes M11, L3, L4 y L7. Para formar la imagen, el plano focal posterior de L3 corresponde al plano focal frontal de L4 y el sensor está situado en el plano focal posterior de L7.

10 **[0070]** En esta configuración, el interferómetro de la invención 15 está representado por las lentes L5, L6 y L7 y la rejilla G.

[0071] El brazo de referencia está provisto de elementos correspondientes a las lentes M11, L3 y L4; respectivamente, las lentes M12, L5 y L6, de tal manera que el haz de referencia y el del objeto, excepto por la muestra, la rejilla G y el elemento de parada óptica 8, son casi idénticos. Esto garantiza un alineamiento correcto de los dos haces en el sensor, en el que interfieren. La naturaleza parcialmente coherente espacialmente de la iluminación así lo requiere.

20 **[0072]** El plano focal frontal de la lente M12, en el que se forma una imagen del componente opcional C, que puede ser un compensador y/o un atenuador de la trayectoria óptica, en el plano focal posterior de L5, que también es el plano focal frontal del L6, en el que se encuentra la rejilla G. La función de la rejilla consiste en redirigir la luz mediante difracción, de tal modo que el haz del objeto y el de referencia que inciden en L7 están separados espacialmente y se propagan en paralelo. Tal como ya se ha demostrado, esta disposición con L5, G, L6 y L7 permite mantener la coherencia temporal en el plano del sensor en el caso de coherencia temporal parcial, y producir una
25 interferencia fuera de eje.

[0073] La lente L7 superpone los haces del objeto y de referencia en el sensor con un ángulo medio entre ellos que se origina a partir de difracción de la rejilla. En esta configuración, el espejo M2 es paralelo a Bs2, y M3 es paralelo a Bs1. La orientación relativa de los divisores de haz y los espejos permite ajustar, sin cambiar las posiciones del haz en el sensor, la trayectoria óptica rotando el mecanismo de rotación RA, al que están fijados firmemente el espejo M2 y el divisor de haz Bs2. Por lo tanto, la configuración permite ecualizar los haces de referencia óptica y de trayectoria del objeto.

35 **[0074]** Esta configuración se puede adaptar a muestras reflexivas, tal como se representa en la fig. 5. En ese caso, se retira el portamuestras Sa y el espejo M2 se sustituye por un tercer divisor de haz Bs3 que ilumina una muestra reflexiva Rs a través de la lente del objetivo ML1. La luz reflejada por la muestra y enfocada por la lente del objetivo se redirige después mediante un tercer divisor de haz Bs3 hacia el segundo divisor de haz, de la misma manera que en la configuración anterior. Se aplica la misma modificación a la trayectoria óptica del haz de referencia, sustituyendo la muestra por un espejo de referencia 16.

40 **Configuración diferencial**

[0075] La configuración Mach-Zehnder resulta adecuada para aplicaciones en las que las variaciones en la trayectoria óptica introducidas por el objeto son limitadas: en el caso de un grosor del objeto muy fluctuante, la densidad de las franjas puede acabar siendo demasiado elevada para ser registrada por el sensor.

[0076] Además, con una iluminación parcial temporal reducida, en la configuración de Mach-Zehnder, el ajuste fino de la trayectoria óptica cuando se cambia el objeto puede resultar difícil. Por ese motivo se propuso la microscopía holográfica digital diferencial. En el último caso, lo que se mide es la fase óptica diferencial, que presenta las ventajas de un intervalo dinámico incrementado para la medición de fase y el ajuste permanente del interferómetro, independientemente del grosor de la muestra.

[0077] Se puede utilizar ventajosamente en modo diferencial la configuración fuera de eje con fuentes parcialmente coherentes, espacial y temporalmente. El esquema óptico está representado por la fig. 6.

55 **[0078]** La fuente parcialmente coherente espacialmente y temporalmente la constituye una fuente (So), una lente de colimación (L1), un microorificio (P) y una lente (L2). El haz es colimado mediante la lente (L1) y filtrado por el microorificio (P) para aumentar la coherencia espacial.

[0079] Tras una reflexión en el espejo M1, el haz de luz ilumina la muestra y es transmitido por la lente del microscopio MI1. El haz de luz procedente de MI1 se divide mediante Bs1 en dos haces correspondientes a un segundo y a un tercer haz de luz. La imagen del plano focal frontal de MI1 situado dentro de la muestra se forma mediante el conjunto de lentes MI1, L3, L4 y L7. Con ese fin, el plano focal posterior de L3 coincide con el plano focal frontal de L4 y el sensor está situado en el plano focal posterior de L7. Del mismo modo, la imagen del plano focal frontal de MI1 se forma mediante el conjunto de lentes MI1, L5, L6 y L7, correspondiendo el plano focal posterior de L3 al plano focal frontal de L4. La distancia entre L4 y L7 es idéntica a la distancia entre L6 y L7.

[0080] Por lo tanto, se forma una imagen en el sensor CCD del mismo plano que el plano de la muestra, correspondiente al plano focal frontal de MI1. Se introduce un desplazamiento entre las imágenes formadas por el segundo y el tercer haz de luz haciendo rotar ligeramente el espejo M2 o el espejo M3. El desplazamiento es únicamente de unos pocos píxeles, o incluso de menos de un píxel en el sensor CCD. Los elementos correspondientes a las lentes L3 y L4 del primer canal óptico 1, respectivamente las lentes L5 y L6, están situados en la trayectoria óptica del tercer haz de luz, de tal manera que la trayectoria óptica tanto del segundo como del tercer haz de luz, a excepción de la muestra, la rejilla G y el elemento de parada óptica 8, son idénticas. Esto permite una alineación correcta con el pequeño desplazamiento de los dos canales en el sensor en el que están interfiriendo.

[0081] Se forma una imagen del plano focal frontal de la lente MI1 en el plano focal posterior de L5, que también es el plano focal posterior de L6, en el que se encuentra la rejilla G. La función de la rejilla consiste en redirigir la luz mediante difracción de manera que los haces incidentes de los dos canales en L7 estén separados espacialmente. La lente L7 superpone los dos haces en el sensor con un ángulo medio entre ellos que se origina a partir de la difracción de la rejilla. En la configuración, el espejo M2 es casi paralelo a Bs2 y M3 a Bs1. Estas orientaciones relativas de los divisores de haz y los espejos permiten el ajuste, sin cambios en las posiciones del haz en el sensor, la trayectoria óptica mediante la rotación del mecanismo de rotación RA al que el espejo M2 y el divisor de haz Bs2 están unidos firmemente. Por lo tanto, la configuración permite equalizar el haz de referencia y el de la trayectoria del objeto.

[0082] El ángulo medio entre el haz del objeto y el de referencia en el sensor proporciona la configuración fuera de eje. Como ya se ha demostrado, hay una alineación correcta, incluso en el caso de una fuente de coherencia temporal parcial, con el fin de proporcionar de manera homogénea un patrón de franjas contrastado a lo largo de todo el sensor CCD. Cabe señalar que se puede colocar un atenuador en la trayectoria óptica del segundo haz de luz para compensar la pérdida de luz originada por la rejilla. Se puede insertar una placa óptica en la trayectoria óptica del tercer haz de luz a fin de compensar la diferencia en la trayectoria óptica introducida entre los dos canales por el atenuador.

[0083] Se puede utilizar una fuente de fluorescencia 17 cuando la muestra de interés es fluorescente, tal como se representa en la fig. 7. Su haz es reflejado por el divisor de haz fluorescente a través de la lente MI1 para iluminar la muestra. La señal fluorescente que se propaga hacia atrás se transmite mediante MI1 y se filtra espectralmente mediante SF con el fin de eliminar la parte de excitación fluorescente antes de que incida en Bs1. Debido a que la lente MI1 está limitada por una apertura, la señal fluorescente incoherente presenta una coherencia espacial parcial cuando surge de MI1, con el resultado de que los dos haces son capaces de interferir, siempre que el desplazamiento sea menor que el de la longitud de coherencia espacial.

REIVINDICACIONES

1. Microscopio holográfico digital fuera de eje, que comprende:
- 5 - una fuente de luz parcialmente coherente espacialmente y temporalmente, dispuesta para producir un primer haz de luz parcialmente coherente (1);
- un plano de registro (10);
- 10 - un objetivo de microscopio (ML1);
- una celda de objeto (Sa) dispuesta para mantener un espécimen que se va a estudiar en un plano focal frontal de dicho objetivo del microscopio, estando dicha celda del objeto (Sa) conjugada ópticamente con dicho plano de registro (10);
- 15 - una rejilla (G) situada en un plano conjugado ópticamente con dicho plano de registro (10), definiendo dicha rejilla (G) una primera y una segunda trayectoria óptica, y estando dicha rejilla (G) dispuesta para dividir el primer haz de luz en un haz de luz difractado de orden distinto de cero a lo largo de la primera trayectoria óptica como haz de luz de referencia, y un segundo haz de luz con un orden de difracción diferente a lo largo de la segunda trayectoria óptica;
- 20 - una primera lente (L5) situada en un punto posterior al objetivo del microscopio, estando dicha rejilla (G) situada en el plano focal posterior de dicha primera lente;
- una segunda lente (L6), estando la rejilla (G) situada en el plano focal frontal de dicha segunda lente (L6) y una
- 25 tercera lente (L7) acoplada ópticamente a dicha segunda lente (L6), estando dicho plano de registro (10) situado en el plano focal posterior de dicha tercera lente (L7) y estando dicha tercera lente dispuesta para recombinar el haz de luz de referencia y el segundo haz de luz para obtener un haz de luz recombinado que incidirá en el plano de registro, en el que interfieren entre sí, en el que la trayectoria óptica del haz de luz de referencia y la trayectoria óptica del segundo haz de luz no difieren en una cantidad mayor que la longitud de coherencia de la fuente de luz.
- 30
2. Microscopio holográfico digital de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la celda del objeto (Sa) está iluminada por el primer haz de luz (1), estando dicho objetivo del microscopio (ML1) situado en un punto anterior a la rejilla (G) y en el que hay una cuña situada en la segunda trayectoria óptica para producir un holograma diferencial.
- 35
3. Microscopio holográfico digital fuera de eje, que comprende:
- una fuente de luz parcialmente coherente espacialmente y temporalmente, dispuesta para producir un primer haz de luz parcialmente coherente (1);
- 40 - un plano de registro (10);
- un objetivo de microscopio (ML1);
- una celda de objeto (Sa) dispuesta para mantener un espécimen que se va a estudiar en un plano focal frontal de
- 45 dicho objetivo del microscopio, estando dicha celda del objeto (Sa) conjugada ópticamente con dicho plano de registro (10);
- una rejilla (G) situada en un plano conjugado ópticamente con dicho plano de registro (10);
- 50 - un interferómetro de tipo Mach-Zehnder, que comprende un primer divisor de haz (Bs1) y un segundo divisor de haz (Bs2), estando dicho primer divisor de haz (Bs1) dispuesto para dividir dicho primer haz de luz en un segundo haz de luz (2) y un tercer haz de luz (3);
- una primera lente (L5) situada en la trayectoria óptica de dicho tercer haz de luz (3), dispuesta para enfocar dicho
- 55 tercer haz de luz en dicha rejilla (G);
- una segunda lente (L6) con el mismo eje óptico que la primera lente (L5) y situada a un distancia focal de la rejilla (G), dispuesta para producir al menos un haz de luz difractado de orden distinto de cero, estando dicho segundo divisor de haz (Bs2) dispuesto para recombinar dicho segundo haz de luz y dicho haz de luz difractado para producir un haz

recombinado;

- un elemento de parada óptica dispuesto para detener la luz difractada de orden cero de dicho tercer haz de luz;

5 - unos medios de registro dispuestos para registrar señales interferométricas producidas por la interacción entre el segundo haz de luz y el haz de luz difractado, estando dichos medios de registro situados en el plano de registro (10) de dicho interferómetro (15);

10 - unos medios de enfoque (L7) dispuestos para enfocar dicho haz recombinado sobre dichos medios de registro, siendo la trayectoria óptica del segundo y el tercer haz de luz esencialmente equivalentes y estando situados la celda del objeto (Sa) y el objetivo del microscopio frente al primer divisor de haz (Bs1), definiendo una configuración holográfica diferencial.

4. Microscopio holográfico digital fuera de eje, que comprende:

15

- una fuente de luz parcialmente coherente espacialmente y temporalmente, dispuesta para producir un primer haz de luz parcialmente coherente (1);

20

- un plano de registro (10);

- un objetivo de microscopio (ML1);

25 - una celda de objeto (Sa) dispuesta para mantener un espécimen que se va a estudiar situado en un plano focal frontal de dicho objetivo del microscopio, estando dicha celda del objeto (Sa) conjugada ópticamente con dicho plano de registro (10);

- una rejilla (G) situada en un plano conjugado ópticamente con dicho plano de registro (10);

30 - un interferómetro de tipo Mach-Zehnder, que comprende un primer divisor de haz (Bs1) y un segundo divisor de haz (Bs2), estando dicho primer divisor de haz (Bs1) dispuesto para dividir dicho primer haz de luz en un segundo haz de luz (2) y un tercer haz de luz (3);

35 - una primera lente (L5) situada en la trayectoria óptica de dicho tercer haz de luz (3), dispuesta para enfocar dicho tercer haz de luz en dicha rejilla (G);

40 - una segunda lente (L6) con el mismo eje óptico que la primera lente (L5) y situada a una distancia focal de la rejilla (G), dispuesta para producir al menos un haz de luz difractado de orden distinto de cero, estando dicho segundo divisor de haz (Bs2) dispuesto para recombinar dicho segundo haz de luz y dicho haz de luz difractado para producir un haz recombinado;

- un elemento de parada óptica dispuesto para detener la luz difractada de orden cero de dicho tercer haz de luz;

45 - unos medios de registro dispuestos para registrar señales interferométricas producidas por la interacción entre el segundo haz de luz y el haz de luz difractado, estando dichos medios de registro situados en el plano de registro (10) de dicho interferómetro (15);

50 - unos medios de enfoque (L7) dispuestos para enfocar dicho haz recombinado sobre dichos medios de registro, siendo la trayectoria óptica del segundo y el tercer haz de luz esencialmente equivalentes, y en los que la celda del objeto (Sa) y el objetivo del microscopio (M11) están situados en la trayectoria óptica del segundo haz de luz (2).

5. Microscopio holográfico digital de acuerdo con la reivindicación 4, en el que un segundo objetivo del microscopio (M12) está situado en la trayectoria óptica del tercer haz de luz (3).

6. Microscopio holográfico digital de acuerdo con la reivindicación 4, que además comprende un tercer divisor de haz (Bs3) situado en la trayectoria del segundo haz de luz para iluminar un objeto reflectante (Rs) y un cuarto divisor de haz (Bs4) situado en la trayectoria del tercer haz de luz para iluminar un espejo de referencia (16), definiendo una geometría de tipo Mach-Zehnder.

7. Microscopio holográfico digital de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

la fuente de luz parcialmente coherente comprende unos medios de iluminación (So) seleccionados entre el grupo formado por un LED, una lámpara de descarga de gas, fuentes térmicas y láser de impulsos.

8. Microscopio holográfico digital de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que dichos 5 medios de registro son unos medios de registro sensibles al color, y la fuente de luz produce de manera simultánea al menos tres longitudes de onda distintas, para registrar un interferograma holográfico en color.
9. Microscopio holográfico digital de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha fuente de luz comprende la menos tres LED de diferentes longitudes de onda.
10. Microscopio holográfico digital de acuerdo con la reivindicación 7 o 8, en el que las distintas longitudes de onda corresponden a cian, magenta y amarillo (CMY) o rojo, verde y azul (RGB) para la reconstrucción del color.
11. Microscopio holográfico digital de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una 15 fuente de excitación por fluorescencia (17) acoplada ópticamente a dicho portamuestras.

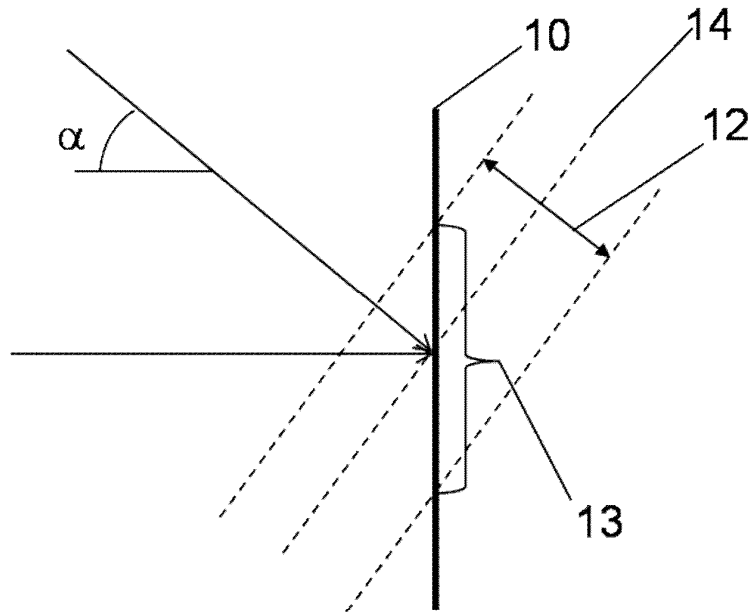


Fig. 1

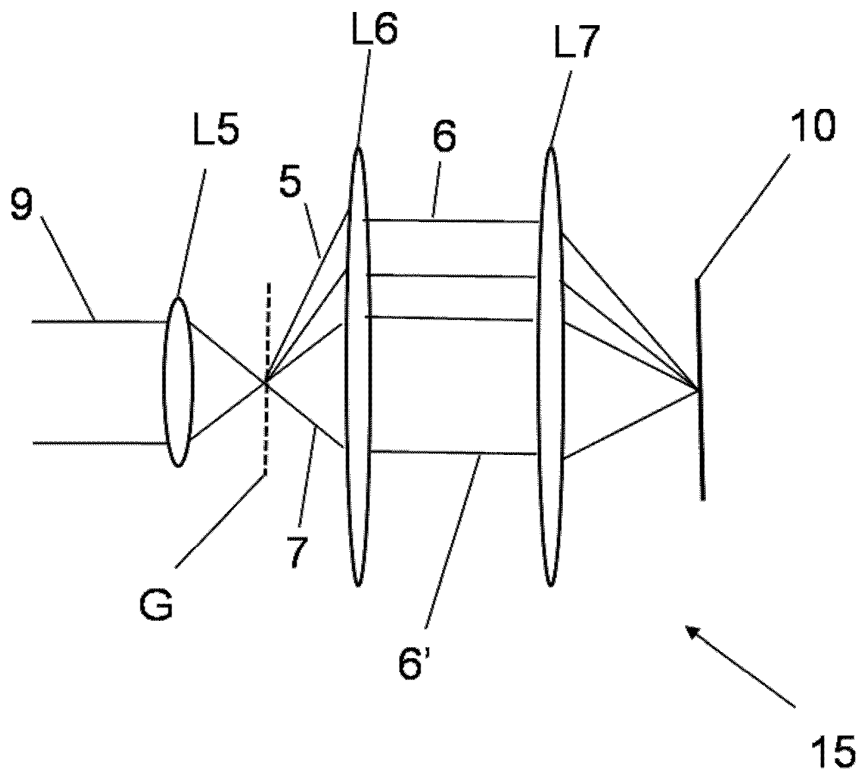


Fig. 2

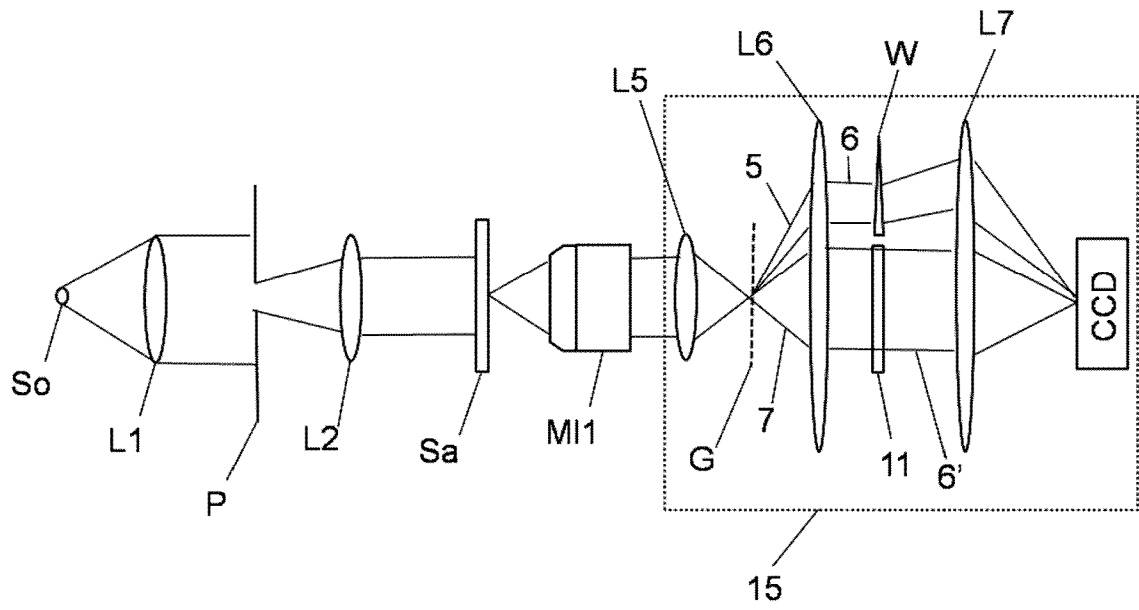


Fig. 3

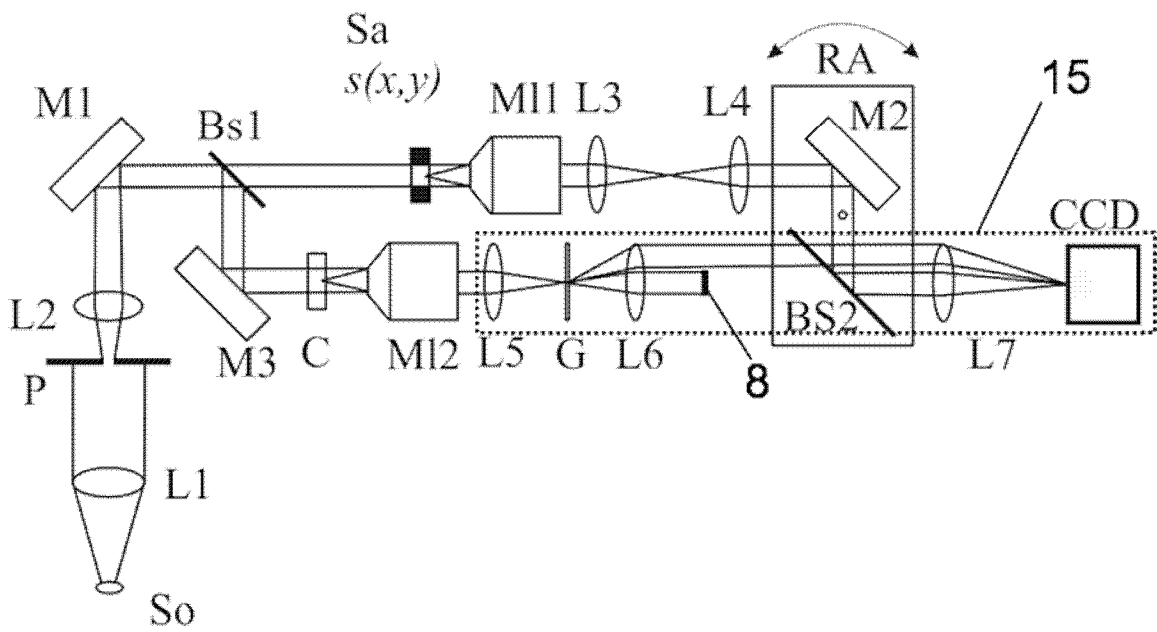


Fig. 4

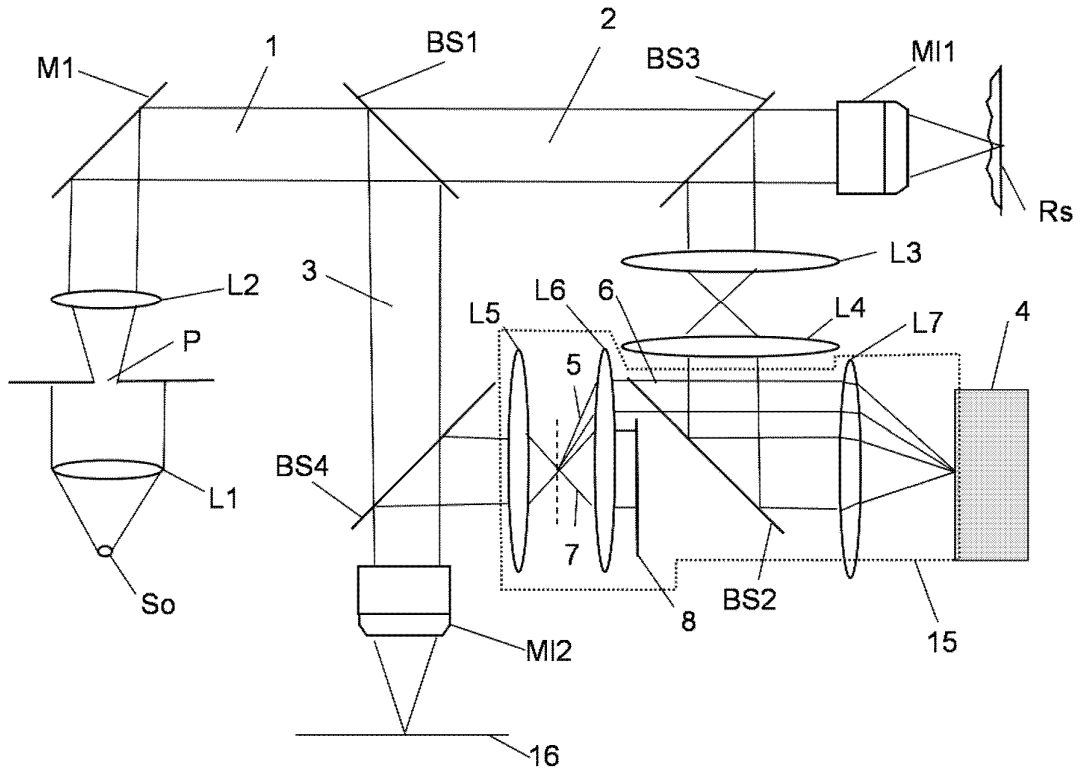


Fig. 5

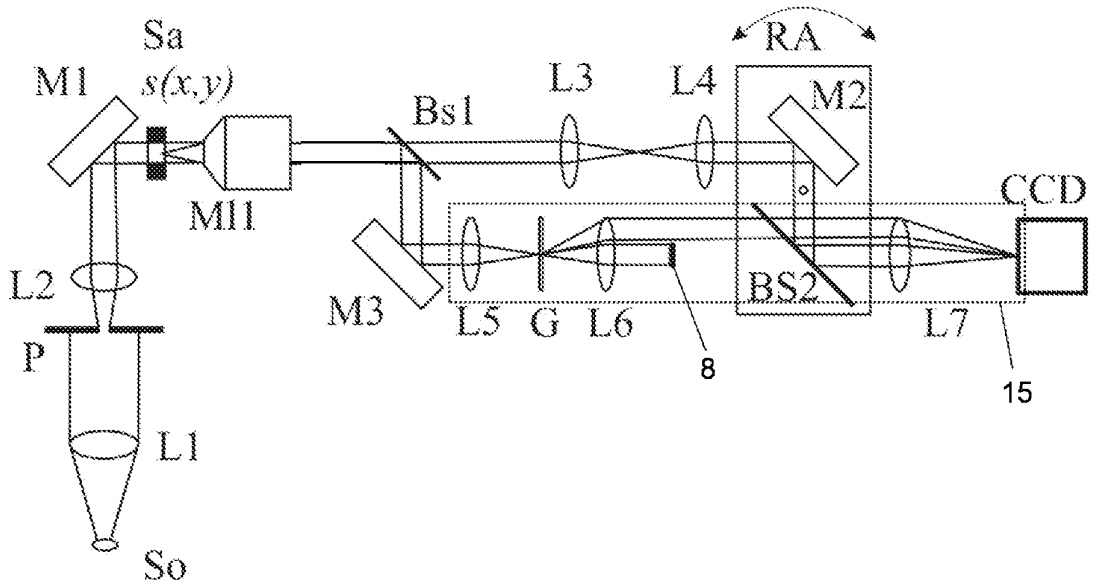


Fig. 6

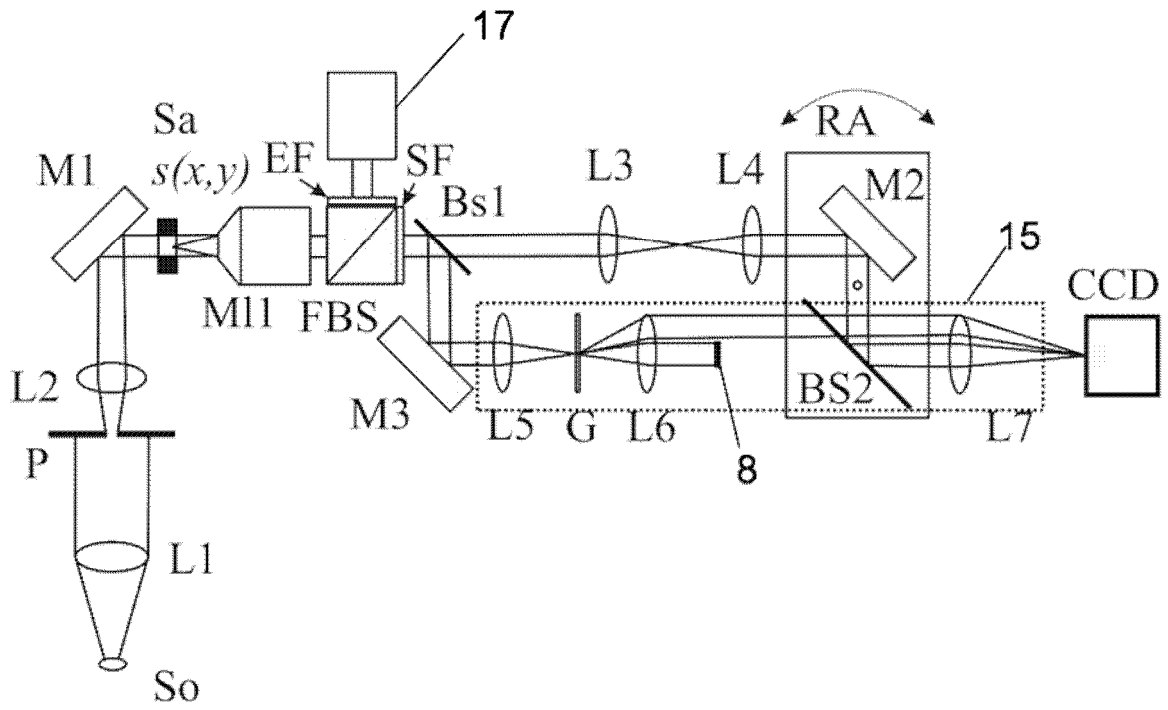


Fig. 7