

Tesis de Licenciatura



Universidad
de
Buenos Aires

FCEyN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Construcción e implementación de un sistema integral de caracterización de filtros ópticos de interferencia de banda utilizados en cámaras hiperespectrales.

Juan Reto Reynal

Director: Prof. Dr. Hernán Grecco
Abril 2020



TEMA: Construcción e implementación de un sistema integral de caracterización de filtros ópticos utilizados en cámaras hiperespectrales.

ALUMNO: Juan Reto Reynal

L.U. N°: 777/12

LUGAR DE TRABAJO: LEC, Departamento de Física, FCEyN, UBA.

DIRECTOR DEL TRABAJO: Dr. Hernán E. Grecco

FECHA DE INICIACIÓN: Abril de 2019

FECHA DE FINALIZACIÓN: Abril de 2020

FECHA DE EXAMEN:

INFORME FINAL APROBADO POR:

Autor:

Jurado

Director:

Jurado

Profesor: Juan Pablo Paz

Jurado

Resumen

Resumen copado al final..
dkfjakdj

Índice

Resumen	iii
Índice	v
1 Introducción	1
Objetivo general	1
Objetivos específicos del proyecto	2
Introducción	2
Actividades y Metodología	8
Factibilidad	9
2 Primer prototipo del equipo y caracterización de los espectros de transmisión	11
3 Cuantificación de los defectos	13
Adquisición de las imágenes de cada banda	13
<i>Tile scan</i>	15
Superficies y mapa de los defectos del filtro	16
Adquisición de imágenes individuales de cada banda espectral	19
Pre-procesamiento de las imágenes de cada banda espectral	20
Algoritmo de detección de los defectos	22
Resultados del algoritmo de detección de los defectos	23
Defectos de la banda NIR	23
Defectos de la banda Roja	24
4 Spectral GUI y software del primer prototipo: Integración clases del espectrómetro y de los motores de thorlabs - Implementación con Multithreading	25
5 Desarrollo XZStage y calibración - Desarrollo del software integrando el arduino con algoritmos asincrónicos	27
6 Montaje Microespectrómetro, caracterización resolución espacial y calibración	29
7 Integración cámara al microespectrómetro	31
8 Conclusiones	33
9 Trabajo a futuro	35
Referencias Bibliográficas	37

Capítulo 1

Introducción

QUÉ ES UN DEFECTO Y QUÉ LE ESTÁ HACIENDO A LAS IMÁGENES, MOSTRAR IMAGEN QUE TIENE PUNTOS CON DIFRACCIÓN, LOS TIFFS..

TÍTULO: Construcción e implementación de un sistema integral de caracterización de filtros ópticos utilizados en cámaras hiperespectrales.

ALUMNO: Juan Reto Reynal L.U. 777/12.

DIRECTOR: Dr. Hernán E. Grecco, Prof. Adj. UBA, Inv. Independiente CONICET.

LUGAR DE TRABAJO: LEC, Departamento de Física, FCEyN, UBA.

Objetivo general

La espectroscopía de imágenes hiperespectrales, en inglés *Hyperspectral Spectroscopy Imaging* (HSI), combina la espectroscopía y la adquisición de imágenes en dos dimensiones. Este método brinda datos espectrales para cada pixel en el campo de visión¹. A partir de dichos datos se puede extraer información sobre la emisión, reflexión ó absorción de una muestra, que puede ser utilizada para determinar su composición físico-química con una resolución espacial. De esta forma se pueden identificar tumores de un cáncer, realizar un control de calidad de la comida identificando bacterias en tiempo real, localizar las células de una muestra biológica u optimizar la siembra y la cosecha de ciertos cultivos, entre otras aplicaciones.

En la tesis de licenciatura de Agustina Pose [Pose, 2017], dirigida por Hernán Grecco quien también dirige esta tesis, ambos desarrollaron un prototipo de cámara hiperespectral para uso satelital junto a la empresa Satellogic. Tras la realización de pruebas y mediciones en tierra, se aprobó la prueba de concepto de este prototipo y se lo adaptó a un diseño robusto.

¹El campo de visión, en inglés *field of view* (FOV), es el ángulo sólido a través del cual un sensor puede detectar la radiación electromagnética que se desee capturar.

La cámara hiperespectral diseñada es hoy una de las cargas útiles (o *payloads*) a bordo de los satélites argentinos NewSat 1 y NewSat 2 (alias Fresco y Batata), puestos en órbita el 30 de Mayo de 2016, construidos por la empresa Satellogic.

En el presente proyecto se propone continuar con dicho trabajo y desarrollar un sistema integral de caracterización de los filtros de interferencia de banda que son utilizados en las cámaras hiperespectrales. Estos filtros permiten el paso de las longitudes de onda (colores) que se desean capturar con el sensor de detección principal de la cámara que sólo detecta intensidad lumínica, como se explica en la Introducción. En consecuencia, la caracterización de los filtros resulta fundamental para garantizar la calidad de las imágenes capturadas. El primer prototipo de este sistema integral permitirá principalmente caracterizar el espectro de transmisión del filtro en cada punto del mismo, es decir en cada posición (x, y) de su superficie, y encontrar defectos que pudieran modificar su capacidad de bloqueo de ciertas longitudes de onda no deseadas.

■ Objetivos específicos del proyecto

- **Objetivo 1:** Caracterización de los espectros de transmisión de los filtros.
- **Objetivo 2:** Detección de los defectos de los filtros (*scratch and dig*).
- **Objetivo 3:** Caracterización de los filtros en su posición final en las cámaras de vuelo del satélite.

■ Introducción

Una imagen a color RGB convencional está compuesta por tres canales de imágenes (bandas): rojo ($\sim 665\text{nm}$), verde ($\sim 550\text{nm}$) y azul ($\sim 470\text{nm}$). Este tipo de imágenes permiten emular la percepción que el ojo humano tiene del color, pero en general no permiten la detección e identificación de distintos objetos sólidos y líquidos, menos aún determinar sus propiedades. Para ello es necesario obtener el espectro completo del objeto de estudio que es posible a partir de la captura de imágenes multiespectrales e hiperespectrales.

Las imágenes multiespectrales contienen un número acotado de bandas espectrales de hasta un par de decenas, con un gran ancho de banda (varias decenas de nm); mientras que las hiperespectrales están formadas por un gran número de bandas espectrales (de cientos a miles), con una resoluciónpectral muy estrecha, de unos pocos nm (Ver Figura 1.1).

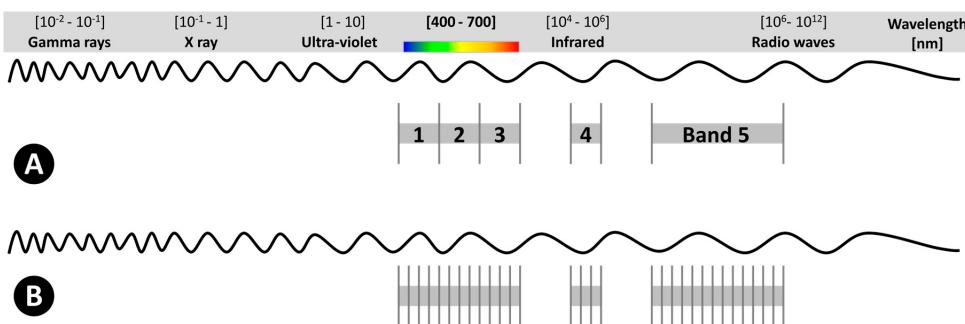


Figura 1.1: Representación de los espectros: (A) Multiespectral: 5 bandas anchas; y, (B) Hiperspectral: muchas bandas muy estrechas, generalmente entre cientos y miles de ellas. Los dibujos no se encuentran realizados a escala. Imagen tomada de [Adão et al., 2017].

Las cámaras de adquisición de imágenes hiperespectrales estándar utilizan redes de difracción o prismas como elementos dispersivos de la luz. La distancia requerida entre el sensor de detección y el componente de difracción de la luz, hace que este tipo de cámaras sean muy grandes y muy pesadas, dos condiciones que por ejemplo en la industria satelital se quieren optimizar fuertemente ya que el costo de la puesta en órbita de los satélites es proporcional a su peso y a su tamaño. Estas cámaras suelen ser muy caras y muy sensibles a desalinearse debido a las condiciones mecánicas de su construcción. Esta última condición se agrava en sistemas de difícil manipulación como lo son los satélites, que una vez que se encuentra en órbita, sus componentes ópticos ya no puede ser modificados como para corregir una desalineación que empeore la calidad de las imágenes capturadas. Además, requieren de una rendija para poder obtener una alta resolución espectral, lo que restringe significativamente la intensidad de la luz a detectar.

En respuesta a las desventajas de las cámaras estándar de imágenes hiperespectrales, aparecieron otro tipo de cámaras que utilizan filtros de interferencia de banda y que resultaron en un producto final robusto, compacto, de bajo costo y de muy buen rendimiento. Una cámara de vuelo de este tipo fue desarrollada en la tesis de licenciatura de Agustina Pose bajo la dirección de Hernán Grecco [Pose, 2017] como se mencionó anteriormente. La cámara desarrollada tiene la gran ventaja de no presentar partes móviles, evitando posibles desalineaciones de los componentes ópticos. Las partes móviles de la cámara que serían útiles para realizar un barrido espectral de una cierta escena a capturar, no son necesarias pues el barrido es realizado por el movimiento propio del satélite respecto de la Tierra. El esquema básico de este tipo de cámaras hiperespectrales se muestra en la Figura 1.2. Los filtros de interferencia de banda utilizados en este tipo de cámaras deben cumplir ciertos requisitos de calidad (no presentar rayones, ni marcas, etc) y ciertas características espectrales y de transmisión antes de ser incorporados a la carga útil de, por ejemplo, un satélite que va a ser puesto en órbita. En consecuencia, resulta fundamental caracterizar completamente dichos filtros antes de construir las cámaras de la aplicación de interés.

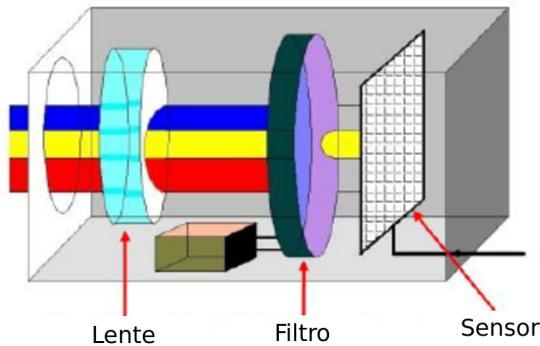


Figura 1.2: Esquema de una cámara hiperespectral. El filtro absorbe el espectro completo de la luz incidente salvo la bandapectral que el usuario determina, por lo que sólo las longitudes de onda elegidas atraviesan el filtro y son detectadas por el sensor. [Martínez-Usó et al., 2008]

Debido a las limitaciones de las técnicas de medición estándard de los espectros de transmisión de los filtros ópticos donde se utilizan espectrómetros comerciales, existen tres discrepancias fundamentales entre el espectro "real"² de un filtro y sus mediciones experimentales realizadas con espectrómetros comerciales (Ver Figura 1.3)[Erdodan and Prabhat, 2012]. La primera discrepancia es el "redondeo" de características espectrales nítidas de los filtros. Esto se debe al ancho de banda no nulo del haz de la sonda del espectrómetro.

La segunda discrepancia se debe al rango limitado de medición de la OD³ del filtro, que es producto de la sensibilidad limitada del espectrómetro. Cuando un filtro tiene un valor de OD muy alto, $OD > 6$, el detector debería medir una intensidad de la luz prácticamente nula pero el ruido óptico y electrónico propio del detector limita el nivel más bajo de intensidad que puede medir con precisión. De esta forma, se puede ver un ruido de piso debido al sensor indicando un cierto valor de OD que no coincide con el valor real del filtro.

²El espectro "real" es el espectro de diseño del filtro para el que fue especialmente construido.

³La densidad óptica, OD (Optical Density), es un parámetro útil para describir la transmisión de la luz a través de un filtro óptico con una transmisión extremadamente baja. Si T es la transmisión del filtro, que varía entre 0 y 1, se define la densidad óptica como $OD = -\log_{10}(T)$.

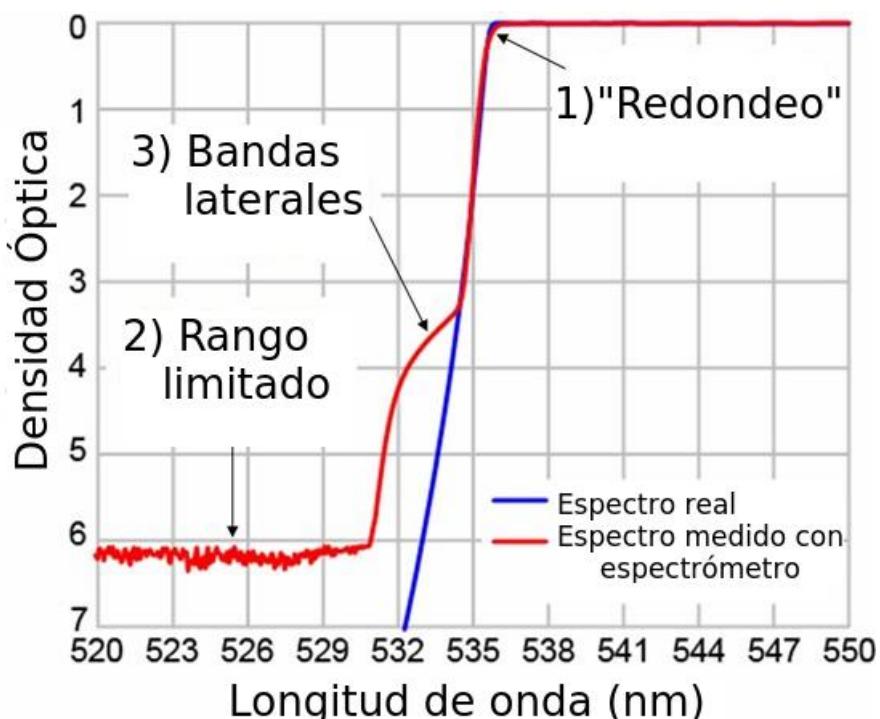


Figura 1.3: Discrepancias entre las mediciones experimentales con espectrómetros comerciales y el espectro "real" de un filtro óptico. Adaptado de [Erdodan and Prabhat, 2012].

La tercera discrepancia es propia de las mediciones de transiciones muy pronunciadas. Esto surge por el hecho de que el haz de la sonda no es monocromático, sino que también tiene bandas laterales débiles de longitudes de onda fuera de su ancho de banda principal.

Las discrepancias de medición en espectrómetros convencionales causan importantes problemas al intentar evaluar el rendimiento del filtro para la aplicación prevista.

La elección del instrumento de medición y la técnica empleada determinan la precisión de la medición del espectro de transmisión del filtro. Al mismo tiempo, determinan la duración y por ende también el costo de dichas mediciones, que deben ser compatibles con los tiempos que la industria requiere. Esto se puede ver con un ejemplo tomado de [Erdodan and Prabhat, 2012]. En la Figura 1.4 se muestran cinco mediciones distintas de la densidad óptica de un filtro diseñado para bloquear longitudes de onda de 532 nm con $OD > 6$ y tener una transición a un estado de alta transmisión dentro del 0.5% de la longitud de onda del láser utilizado para excitar la muestra, que es de 534.7nm.

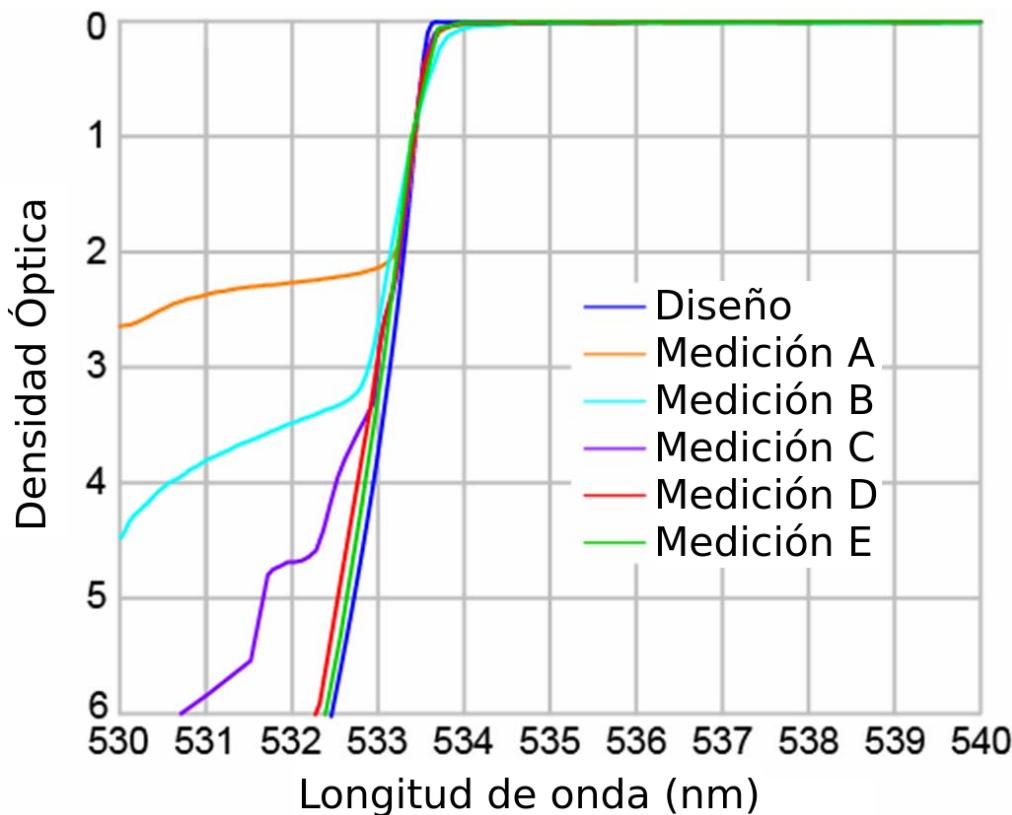


Figura 1.4: Distintas mediciones de la OD de un filtro LP03-532RE-25 RazorEdge de la empresa Semrock. Las mediciones fueron realizadas utilizando tanto espectrómetros comerciales como *custom-made* de la empresa con una variedad de arreglos experimentales que se explican en el texto. Adaptado de [Erdodan and Prabhat, 2012].

Las mediciones del método A fueron realizadas por un espectrómetro de diseño propio (*custom-built*) de la empresa, que tiene un tiempo de integración muy corto y una baja resolución, lo que resulta en una configuración experimental óptima para obtener mediciones de una gran cantidad de filtros de prueba. Este método es utilizado para determinar con precisión la longitud de onda a partir de la cual el filtro pasa a tener una alta transmisión, es decir, localiza la longitud de onda de la transición entre el estado de bloqueo y de transmisión del filtro, la longitud de onda de corte. De esta forma, se garantiza una cierta uniformidad en un lote de filtros a ser utilizado de una forma rápida y eficiente. Ahora bien, como se observa en el gráfico de la Figura 1.4, el método A posee una sensibilidad muy mala y una resolución muy baja, obteniéndose un piso de ruido mayor a OD 2.

El método B utiliza un espectrómetro comercial (Perkin Elmer Lambda 900) cuyos inconvenientes fueron explicados a partir de las tres discrepancias en la Figura 1.3. Con este método no se puede asegurar que el filtro tenga un $OD > 6$ en los 532nm.

Los métodos C y D utilizan el mismo espectrómetro *custom-built* del método A, cuyo principio de funcionamiento básico se muestra en la Figura 1.5. La diferencia fundamental con el método B que utiliza un espectrómetro comercial es que las mediciones con el espectrómetro

custom-built realizan la detección con una cámara CMOS de bajo ruido, que consiste en un arreglo de detectores, por lo que puede medir en un rango muy grande de longitudes de onda simultáneamente. Este método permite en consecuencia obtener mediciones en un rango espectral muy grande, con una cierta resolución en un cierto tiempo de integración, de forma muy rápida. El inconveniente fundamental de este método es que al utilizar una fuente de iluminación de banda ancha, si el filtro de prueba tuviera, por ejemplo, una autofluorescencia apreciable [Shah and Yager, 2017], podría interferir con una medición precisa de la transmisión de la muestra.

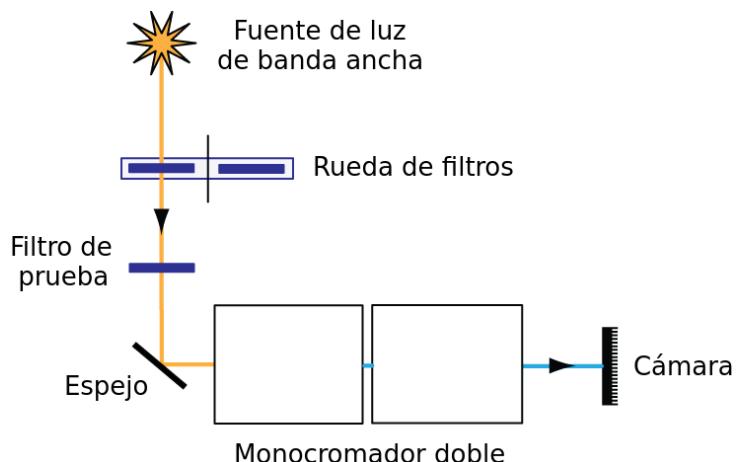


Figura 1.5: Diseño básico de un espectrómetro *custom-built* que utiliza una fuente de iluminación de banda ancha y permite la recolección de una amplia gama de longitudes de onda simultáneamente con un conjunto de detectores situados en la cámara. Este arreglo experimental permite una medición más rápida con un piso de ruido y una resolución fija. Adaptado de [Erdodan and Prabhat, 2012].

Ahora bien, dependiendo de la aplicación, las limitaciones en las mediciones del espectro de transmisión de los filtros pueden ser determinantes o no. En el presente proyecto se quiere determinar el arreglo experimental óptimo pero que sea compatible con los tiempos y costos de producción de la industria satelital.

En ciertos filtros y aplicaciones, resulta de vital importancia el nivel de bloqueo de ciertos rangos de longitudes de onda pero no así la suavidad de la transición entre el bloqueo y la transmisión. Por ejemplo, en sistemas de imágenes de fluorescencia los espectros de absorción y emisión del flúor podrían estar lo suficientemente alejados como para que resulte fundamental que los filtros de banda de la señal de respuesta (de emisión) de la muestra tengan un bloqueo muy alto en la banda de la señal de excitación y así lograr una relación entre la señal y el ruido de adecuada proporción [Grecco et al., 2016].

Los filtros diseñados para estas aplicaciones podrían tener decenas de OD de bloqueo pero en la práctica incluso el más pequeño de los defectos físicos en los recubrimientos ópticos (*coatings*) o en el montaje, así como el bajo nivel de control de luz parásita a nivel del sistema, puede limitar el bloqueo alcanzable a valores mucho menores que los del diseño original, en el rango de aproximadamente OD 6 a quizás 10.

Dado que los espectrómetros comerciales standard tienen una medición de OD de rango limitado debido al ruido de fondo del instrumento, se propone un arreglo experimental inicial para poder medir los niveles de bloqueo más altos con precisión como se muestra en la Figura 1.6 y que resulta compatible con la producción industrial deseada por su simplicidad.

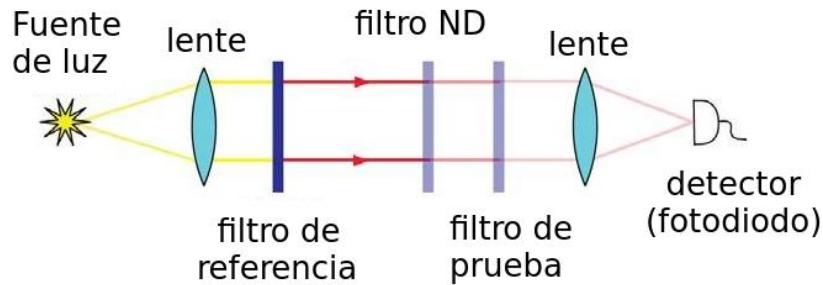


Figura 1.6: Arreglo experimental compatible con la producción industrial para medir valores de OD altos.

El método experimental de la Figura 1.6 se denomina *complementary filter method*. Un haz de luz de banda ancha, de una lámpara QTH (*Quartz-Tungsten Halogen*) ó de arco, aproximadamente colimado por una lente es filtrado utilizando un filtro de referencia ampliamente bloqueador, que es esencialmente un filtro de banda con su banda de paso superpuesta a la región del espectro del filtro de prueba que se quiere analizar donde la medición de valores de OD altos son necesarios. La luz transmitida es enfocada con una lente convergente en un detector de bajo ruido capaz de medir niveles de intensidad de luz muy pequeños, como un fotodiodo de gran área con un circuito amplificador de bajo ruido ó un tubo fotomultiplicador (PMT).

Las mediciones se realizan de la siguiente manera. En primer lugar, se mide la intensidad de la señal en el detector con solo el filtro de referencia y un filtro calibrado de densidad neutra (ND) en la trayectoria de la luz. El filtro ND sirve para reducir el nivel de la intensidad de la luz en el detector en una cantidad calibrada de forma tal que el bias⁴ del rango dinámico limitado alcanzable por el detector sea reducido para alcanzar los niveles de la señal que el detector va a ver cuando se coloquen los filtros de prueba. En particular, con un filtro ND 3, el rango dinámico del detector tiene que ser de 10^6 para medir hasta un valor de OD 9 de bloqueo. En segundo lugar, se retira el filtro ND y se lo reemplaza por el filtro de prueba para realizar una nueva medición de la intensidad con el detector. El cociente entre las dos mediciones de intensidad de la luz es igual al valor de OD del filtro de prueba, en el rangopectral del filtro de referencia.

■ Actividades y Metodología

En el presente trabajo de tesis se desarrollarán múltiples arreglos experimentales para caracterizar el espectro de transmisión de distintos filtros de prueba que dispone el LEC,

⁴El bias del detector es el valor medido por el instrumento cuando no hay ninguna fuente de luz incidiendo sobre él, es el valor de *offset* que se le suma a cualquier medición.

utilizando técnicas de medición en línea con los papers y patentes de la actualidad. Se automatizará la adquisición de las mediciones y se incorporará al arreglo experimental inicial un sistema de detección de defectos de los filtros, utilizando una cámara de bajo costo del laboratorio para realizar las primeras pruebas.

Una vez caracterizado tanto el espectro como los defectos de los filtros, se diseñará y construirá un primer prototipo de un sistema integral de caracterización para ser aplicado con los filtros que utiliza la empresa Satellogic en sus cámaras hiperespectrales. Se estudiará la aplicabilidad de este prototipo en distintos casos.

Utilizando el prototipo del sistema integral de caracterización de los filtros se desarrollará un método y criterios para decidir si un filtro puede ser incorporado a la cámara utilizada en los satélites.

Como aplicación de este proyecto de tesis se utilizarán las cámaras hiperespectrales de la empresa Satellogic, cuyos filtros van a ser caracterizados con el sistema integral que se va a desarrollar, y se tomarán imágenes en tierra utilizando algoritmos de HDR y de búsqueda de características. Y, finalmente se realizará una caracterización de los filtros en su posición final en las cámaras de vuelo del satélite.

El cronograma mensual de trabajo se muestra en la siguiente Tabla:

■ Factibilidad

El lugar de trabajo donde el tesista va a desarrollar sus actividades es el Laboratorio de Electrónica Cuántica (LEC) del Departamento de Física de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. El LEC cuenta con diversos equipos de uso general en óptica y electrónica y algunos de uso específico para aplicaciones en investigación de física básica. Entre los equipos de uso relevante para el presente proyecto se pueden encontrar mesas ópticas de suspensión neumática, un microscopio invertido automático Zeiss Observer Z1, diversas placas de adquisición y procesamiento (NI y Red Pitaya, Raspberry Pi y Arduino), cámaras científicas y de bajo ruido (Apogee U2000, QHY183M), elementos de óptica para la construcción de instrumentos (lentes, filtros, objetivos de microscopio, optomecánica, láseres y leds). Adicionalmente, el laboratorio cuenta con acceso a un microscopio confocal de la firma Olympus, modelo FV1000 equipado con una placa motorizada, cámara ambiental y cámara CCD.

El director de la presente tesis es director del LEC y es experto en temas de óptica y fotofísica, áreas principales del proyecto. Además, tiene la experiencia de haber dirigido a una estudiante que realizó la tesis en conjunto con el LEC y la empresa Satellogic, resultando en una experiencia exitosa.

El tesista se encuentra cursando actualmente sus últimas dos materias de la carrera: Estructura de la Materia 4 e Instrumentación y Control.

Capítulo 2

Primer prototipo del equipo y caracterización de los espectros de transmisión

Capítulo 3

Cuantificación de los defectos

Qdefects_analysis

En este capítulo se describe la cuantificación de los defectos de cada una de las bandas espectrales que el filtro presenta, determinados a partir de la adquisición de imágenes por transmisión en condiciones de *bright field*¹ con un microscopio invertido. Se explica el proceso de adquisición de las imágenes de cada banda del filtro y su posterior procesamiento.

Asimismo, se detalla el algoritmo utilizado para realizar la detección de los defectos en las imágenes adquiridas y se analizan los resultados: número de defectos por unidad de superficie, diámetro y área de los defectos, etc. Finalmente, considerando las reglamentaciones vigentes en la industria, se explica la aplicación de criterios de normas de calidad que permiten determinar que el filtro analizado no cumple las especificaciones técnicas necesarias para ser montado en un sensor de imagen para aplicaciones aeroespaciales.

■ Adquisición de las imágenes de cada banda

Para la adquisición de las imágenes del filtro se utilizó un microscopio invertido Zeiss Axio Observer Z1 como se muestra en la Figura 3.1, utilizando un objetivo Zeiss N-Achroplan de magnificación 10X y apertura numérica de 0.25.

¹Técnica de iluminación que en castellano suele ser denominada de 'campo brillante' para diferenciarla de la iluminación de campo oscuro (en inglés *dark field*).

3. Cuantificación de los defectos



Figura 3.1: Microscopio invertido Zeiss Axio Observer Z1.

Las imágenes del filtro fueron adquiridas por transmisión utilizando una fuente de luz blanca. Se montó el filtro sobre el portamuestras de la platina del microscopio como se muestra en la Figura 3.2 y mirando por el ocular se puso en foco la superficie del filtro a medir.

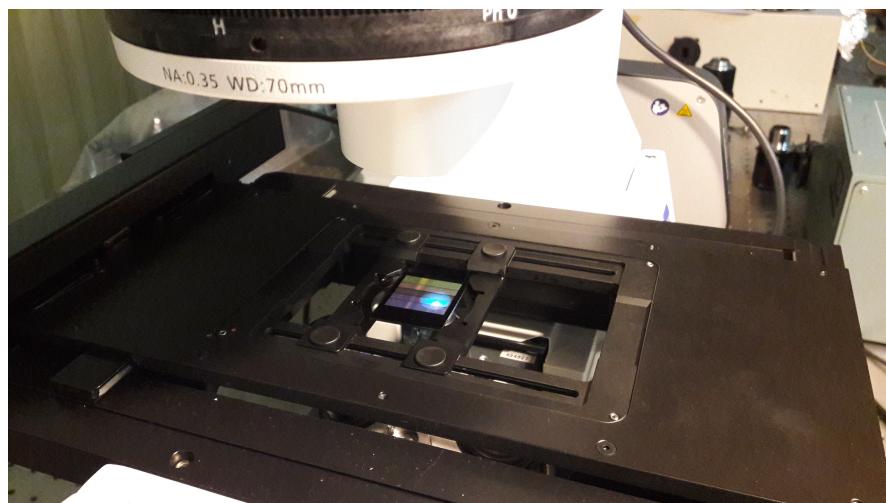


Figura 3.2:

La cámara monocromática del microscopio del fabricante Zeiss, modelo Axiocam 702, con un sensor CMOS de 1/1.2" (diagonal de 13.3mm) y 2.3 megapíxeles, fue controlada a través del software ZEN 2.5 (Blue edition, 2018) del mismo fabricante. Se utilizó la calibración de la cámara que viene de fábrica del microscopio, donde 1 pixel equivale a $0.586 \mu\text{m} \times 0.586 \mu\text{m}$.

Se configuró el software para adquirir las imágenes por transmisión, en particular se eligió la fuente de luz blanca y para cada medición su intensidad, además del tiempo de exposición de la cámara. Como la cámara tiene otro arreglo óptico que el ocular, el plano focal de la superficie del filtro elegida para medir se encuentra a una distancia distinta entre el objetivo y la muestra. En consecuencia, con las perillas manuales del microscopio se pone en foco la imagen observando la adquisición en vivo en la computadora.

■ **Tile scan**

A continuación se explica cómo se adquirieron las imágenes para una determinada región del filtro, ya sea para el filtro completo a excepción de la banda del NIR² ó para cada banda espectral del filtro en particular.

La palabra en inglés *tile* significa baldosa(ver Figura 3.3) en castellano y realizar un *tile scan* implica realizar un barrido de adquisición de imágenes de una cierta área a elección de una muestra donde el área total a adquirir está compuesta por múltiples baldosas. Cada baldosa, es decir cada *tile* constituye una imagen del microscopio de acuerdo al *field of view* (FOV)³ que se tiene del arreglo óptico de la cámara integrada al microscopio.

Hay distintas formas de elegir el área total a adquirir en el software. Se eligió la opción de determinar la región a adquirir a partir de la elección visual individual vía *click* de las cuatro esquinas de la misma, como se muestra en la Figura 3.3. Para elegir estas esquinas el microscopio cuenta con un *joystick* que permite mover la platina motorizada del microscopio en el plano de la imagen.

Entre otros parámetros del barrido, se elige el *overlap* entre las baldosas, es decir la superposición entre las mismas que luego permite obtener una imagen completa individual, realizando un *stitching*⁴ como post-procesamiento de las imágenes. Este último procedimiento

²NIR, en inglés *Near-Infrared*, se le denomina a la región espectral del infrarrojo cercano que se extiende aproximadamente desde los 780 nm hasta los 2000 nm.

³En castellano es el campo de visión y representa el área física de la imagen, que para el caso de una cámara el FOV viene dado por el cociente entre el tamaño del sensor CMOS y la magnificación del microscopio.

⁴El *stitching* de las imágenes (baldosas) es el 'pegado' de cada una con sus vecinas para que en la imagen final no se observen los bordes de cada baldosa sino que la imagen completa se vea como si hubiese sido adquirida individualmente.

3. Cuantificación de los defectos

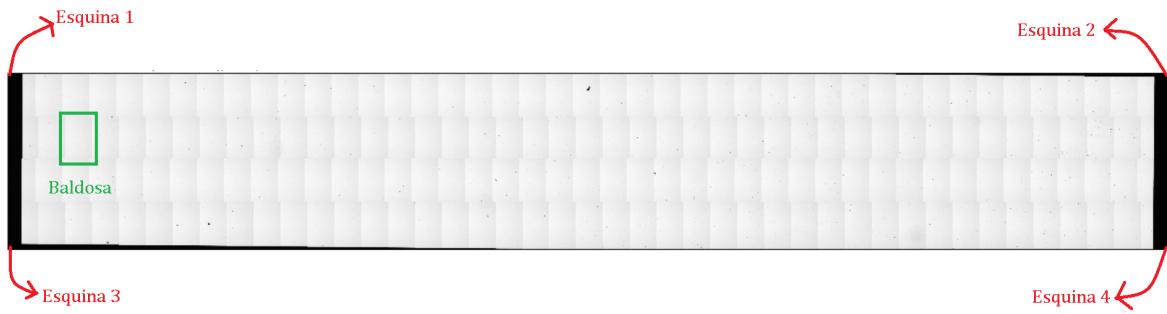


Figura 3.3: *Tile scan* de la banda pancromática.

también fue realizado con el software de Zeiss. Se configuró el *overlap* en 10% para todas las mediciones, siendo este valor el mínimo encontrado para que el *stitching* entre las imágenes consecutivas sea realizado correctamente sin dejar espacios en blanco y para que dicha superposición elimine la menor cantidad de defectos posibles. Por último, se elige en la configuración que cada baldosa sea exportada como una imagen individual para su posterior análisis.

■ Superficies y mapa de los defectos del filtro

Se adquirieron imágenes completas del filtro, a excepción de la banda espectral del NIR, para las dos superficies exteriores del filtro como se muestra en las Figuras 3.4 y 3.5.

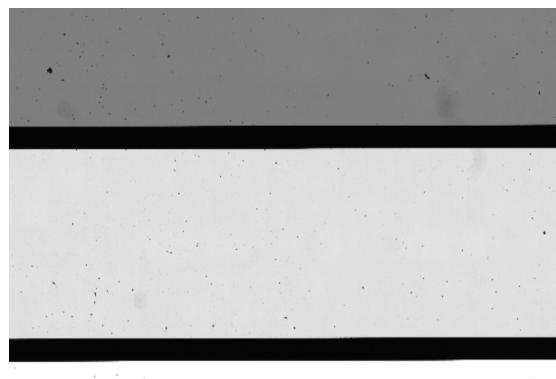
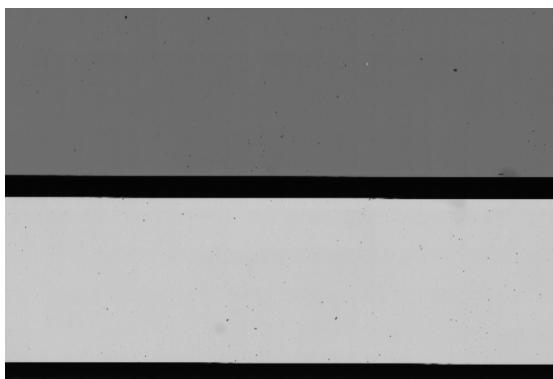


Figura 3.4: Imagen de la superficie exterior superior del filtro, para un barrido de 15.18 mm x 15.30 m.

Figura 3.5: Imagen de la superficie exterior inferior del filtro, para un barrido de 22.09 mm x 16.24 mm.

En las Figuras 3.4 y 3.5 se muestran las bandas espectrales del filtro en orden descendente: Celeste (450-510 nm), Verde (510-580 nm), Pancromática (450-750 nm), Roja (590-690 nm). El brillo, el contraste y el tamaño de las imágenes originales fueron modificados para obtener una mejor visualización, utilizando el software FIJI-ImageJ.

Para realizar el barrido completo de cada superficie se verificó en las cuatro esquinas de la superficie a medir que no se pierda el foco de la imagen. Se eligió la intensidad de la fuente de luz y el tiempo de integración de la cámara tales que no saturen alguna de las bandas del filtro de forma tal poder adquirir una imagen completa del filtro en un solo barrido, y de forma tal que se utilice la mayor parte del rango dinámico de la cámara, como se muestra en la Figura 3.6 el histograma de la intensidad de los píxeles de la cámara para el barrido de la Figura 3.4.

Se hace notar que la banda del NIR no pudo ser adquirida en el barrido completo de las superficies exteriores del filtro pues con los valores de intensidad de la lámpara y del tiempo

3. Cuantificación de los defectos

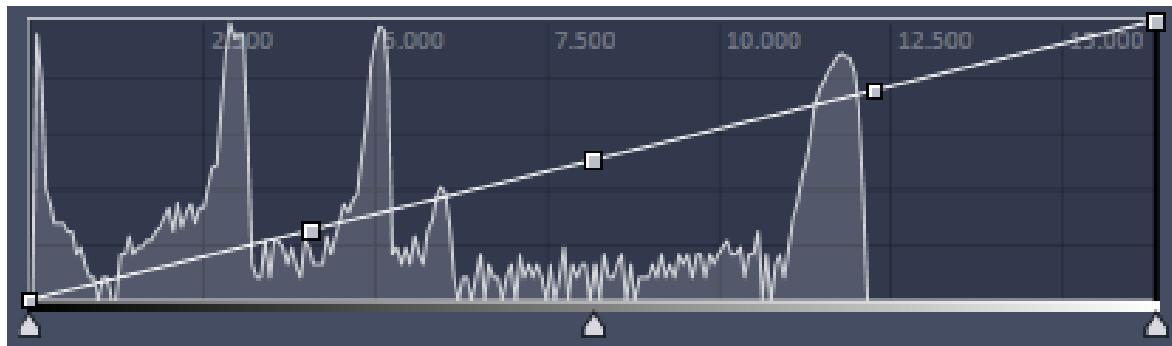


Figura 3.6: Histograma de la intensidad de los píxeles de la cámara del barrido de la superficie exterior superior del filtro.

de adquisición de la cámara fijados para que ninguna de las bandas del filtro saturase⁵, no era posible obtener una buena calidad de la imagen en esa banda. Si bien la cámara tiene un rango de sensibilidadpectral comprendido entre los 350 nm y los 1000 nm de acuerdo a su hoja de datos [?], del gráfico de la eficiencia cuántica⁶ se desprende que para la región spectral del NIR tiene una eficiencia cuántica menor al 30% (Ver Figura 3.7). A esto se le suma el hecho de que la fuente de luz tiene un espectro de emisión de baja intensidad en la región del NIR, como se muestra en la Figura 3.8. Dicho espectro fue medido con el espectrómetro CCS200 de Thorlabs. Ahora bien, la banda spectral del NIR fue medida individualmente posteriormente como se explica más adelante. Para poder obtener una imagen del filtro completo, incluida la banda del NIR, se debería cambiar la fuente de luz que tenga una mayor intensidad en dicha región.

⁵Si se aumentaban estos dos parámetros de la adquisición se saturaba en particular la banda spectral pancromática.

⁶La eficiencia cuántica, en inglés *Quantum efficiency* (QE), es una medida precisa de la sensibilidad de un dispositivo fotosensible que permite determinar como es la respuesta del dispositivo para cada longitud de onda.

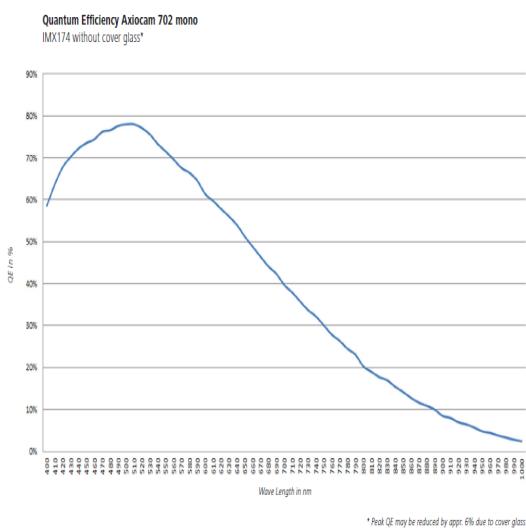


Figura 3.7: Gráfico de la eficiencia cuántica de la cámara monocromática del microscopio Axiocam 702 en función de la longitud de onda.

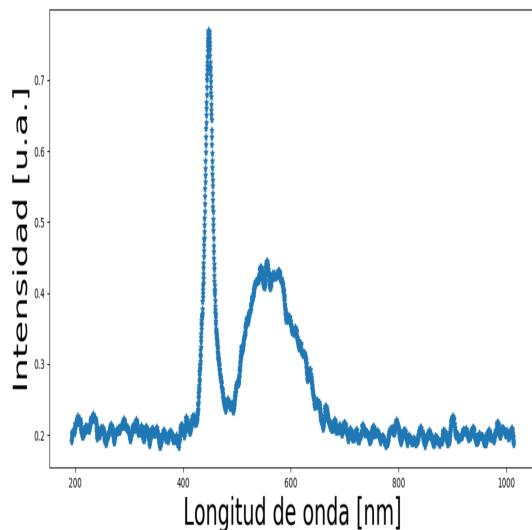


Figura 3.8: Espectro de emisión de la fuente de luz del microscopio.

La imagen completa de cada superficie exterior del filtro permitió:

- Realizar un primer diagnóstico visual por imagen de la calidad óptica de construcción del filtro.
- Observar la cantidad y tipo de defectos así como la densidad de los mismos.
- Determinar que ninguna de las dos superficies exteriores del filtro presentaba una cantidad mayor notable de defectos que la otra como se puede observar en las Figuras 3.4 y 3.5, por lo que el análisis individual de cada una de las bandas fue realizado sobre una de las caras únicamente.
- Obtener un mapa de los defectos con su ubicación precisa en la superficie del filtro.

■ **Adquisición de imágenes individuales de cada banda espectral**

Para realizar una cuantificación de los defectos del filtro, se adquirieron imágenes individuales de cada banda espectral del filtro para una de las superficies exteriores del filtro. Para cada banda, se configuró la intensidad de la lámpara y el tiempo de integración de la cámara

de forma tal de utilizar la mayor parte del rango dinámico de la cámara que se encuentra alrededor del 70 % recomendado por el fabricante y de esta forma obtener la mejor calidad de imagen para cada banda y para su posterior análisis.

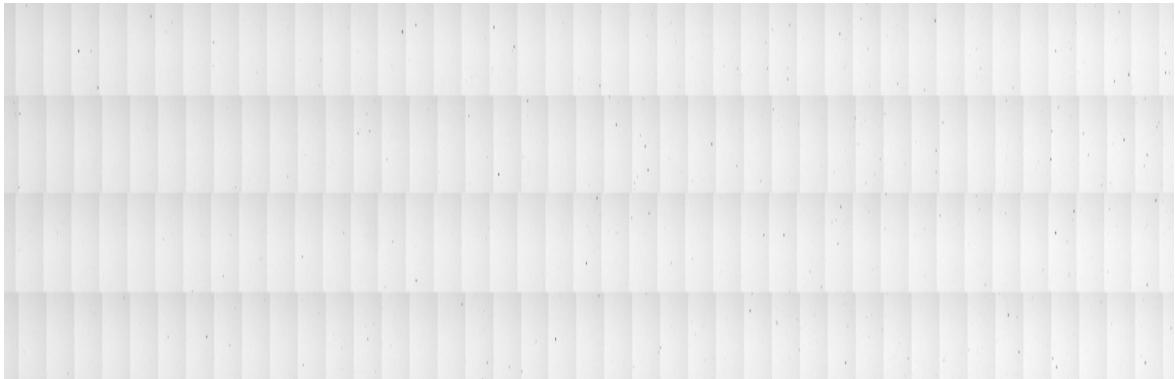


Figura 3.9: Imagen de la banda roja del filtro obtenida mediante un *Tile scan*.

En la Figura 3.9 se muestra la adquisición de la banda roja obtenida mediante un *tile scan* de 27.65 mm x 4.16 mm, intensidad de la lámpara configurada en 30% y el tiempo de exposición de la cámara fue de 13 ms. En la sección de Resultados se muestran las imágenes de cada banda utilizadas para su análisis y su discusión.

■ Pre-procesamiento de las imágenes de cada banda espectral

El análisis de las imágenes fue realizado sobre cada *tile* individual del barrido completo de una banda, dado que su tamaño típico es de 3 MB por lo que el procesamiento en la computadora es mucho más rápido que el de analizar las imágenes de una banda completa, de tamaños típicos de 1 GB ó del filtro completo que tienen más de 5 GB.

El pre-procesamiento de las imágenes de cada banda espectral consiste en la corrección en las imágenes de la iluminación no uniforme del microscopio que se realiza normalizando las imágenes individuales del barrido con una imagen de fondo. Este preprocesamiento consiste de dos pasos:

1. Se construyó cada imagen de fondo a partir de tomar la mediana de cada píxel de todas las imágenes adquiridas en el *tile scan* [?]. Esta imagen de fondo contiene la información

de cada píxel que está presente en todas las imágenes adquiridas en el barrido completo de una banda y debe ser generada para cada banda en particular, considerando que cada una de ellas fue adquirida en ciertas condiciones de intensidad de la fuente de luz y del tiempo de integración de la cámara.

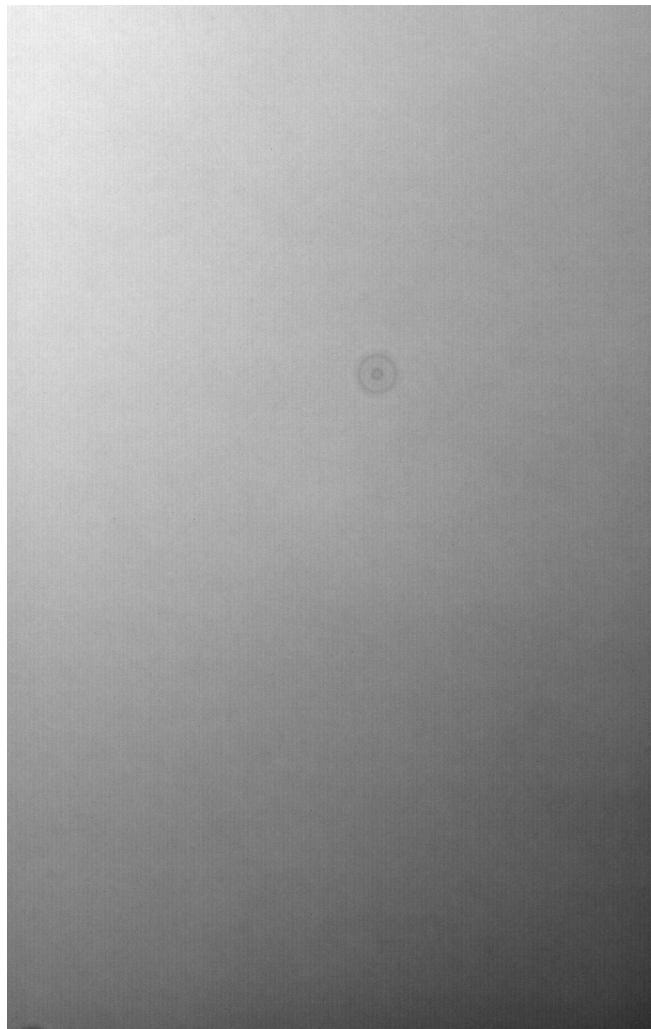


Figura 3.10: Imagen de fondo de la banda celeste del filtro obtenida tomando la mediana para cada píxel de todas las imágenes del barrido.

En la Figura 3.16 se muestra la imagen de fondo adquirida para la banda celeste, cuya intensidad de la fuente de luz fue configurada en 30% y el tiempo de integración de la cámara fue de 40 ms. Los dos discos concéntricos que se observan en la imagen son resultado de un defecto en algún componente óptico del microscopio, ya advertido por otros usuarios del equipo. El código escrito de la construcción de la imagen de fondo se

puede ver en el siguiente link: [Q](#).

2. Con la imagen de fondo ya construida, se normalizaron las imágenes originales del barrido completo de una banda. En las Figuras 3.11 y 3.12 se muestra una imagen de una *tile* individual del barrido de la banda del NIR antes y después de ser normalizada, respectivamente. El código escrito de este paso se puede ver en el siguiente link: [Q](#).

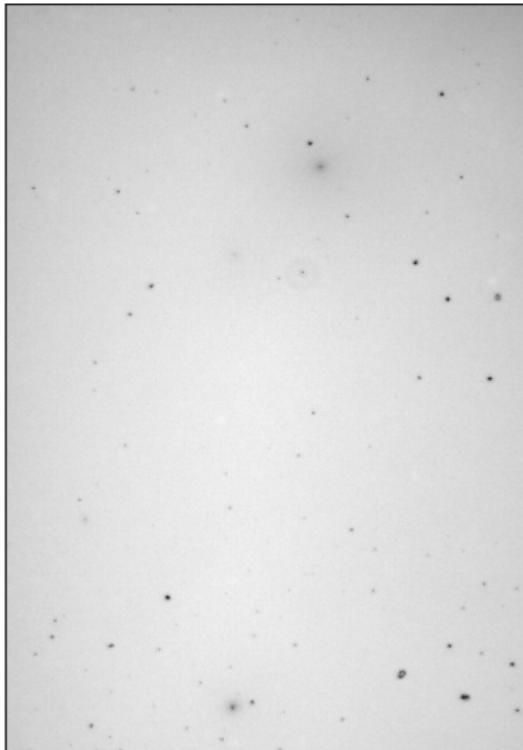


Figura 3.11: Imagen original de una *tile* del barrido completo de la banda del NIR.

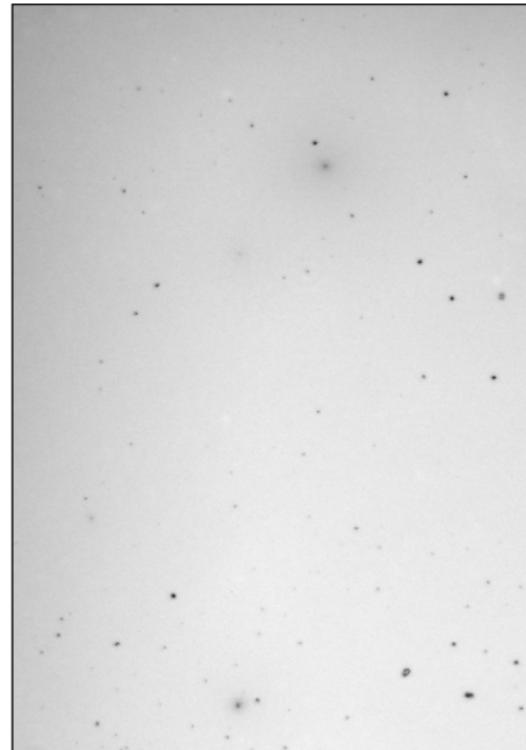


Figura 3.12: Imagen normalizada a partir de la imagen de fondo.

Algoritmo de detección de los defectos

Con las imágenes pre-procesadas la detección de los defectos fue realizada utilizando algoritmos de procesamiento de imágenes. El algoritmo consistió de los siguientes pasos:

1. Se determina el valor de intensidad umbral (en adelante, *threshold*) a partir del cual se distingue entre un defecto en la región de la imagen que se *foreground* y el fondo de la imagen (*background*).

Resultados del algoritmo de detección de los defectos

Los resultados del algoritmo de detección de los defectos son guardados en un archivo *pickle*⁷ que puede ser abierto y manipulados sus datos con la librería *pandas* de python en el marco de lo que se conoce como un *pandas dataframe* que no es más que un objeto de python que permite una manipulación de los datos muy eficiente. A continuación se muestra un resumen de los resultados para cada bandapectral del filtro.

Defectos de la banda NIR

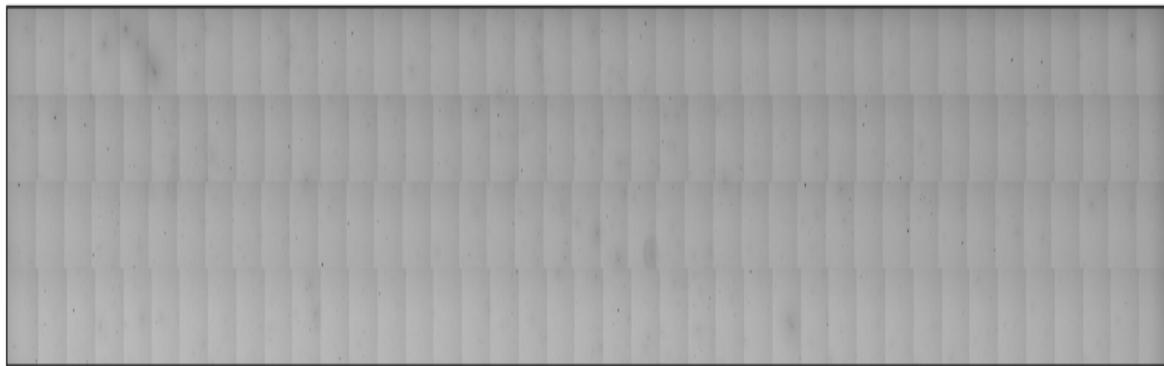


Figura 3.13: *tile scan* obtenido de la banda NIR de 26.37 mm x 4.16 mm.

	area	convex_area	filled_area	major_axis_length	minor_axis_length	perimeter	equivalent_diameter	extent
count	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000
mean	11.845848	13.197703	11.886051	2.600231	1.930322	7.065595	2.478173	0.291777
std	47.890591	59.024982	48.428370	4.001639	2.880403	15.543934	2.990365	0.055742
min	0.343396	0.343396	0.343396	0.000000	0.000000	0.000000	0.661230	0.064837
25%	0.343396	0.343396	0.343396	0.000000	0.000000	0.000000	0.661230	0.248008
50%	1.373584	1.373584	1.373584	1.657458	1.048269	2.344000	1.322460	0.300472
75%	7.554712	8.241504	7.554712	3.621145	2.814330	9.003281	3.101445	0.343396
max	2918.866000	3896.171016	2974.496152	129.783100	32.317103	787.081397	60.962412	0.343396

Figura 3.14: Tabla del resumen de resultados del dataframe de la banda NIR.

⁷Con el módulo *pickle* de python se puede serializar cualquier tipo de objeto de python y guardarse en un archivo *pickle*, de extensión .pkl, que resulta muy eficiente tanto en su escritura como en su lectura.

Defectos de la banda Roja



Figura 3.15: tile scan obtenido de la banda roja de 26.37 mm x 3.15 mm.

	area	convex_area	filled_area	major_axis_length	minor_axis_length	perimeter	equivalent_diameter	extent
count	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000	8755.000000
mean	11.845848	13.197703	11.886051	2.600231	1.930322	7.065595	2.478173	0.291777
std	47.890591	59.024982	48.428370	4.001639	2.880403	15.543934	2.990365	0.055742
min	0.343396	0.343396	0.343396	0.000000	0.000000	0.000000	0.661230	0.064837
25%	0.343396	0.343396	0.343396	0.000000	0.000000	0.000000	0.661230	0.248008
50%	1.373584	1.373584	1.373584	1.657458	1.048269	2.344000	1.322460	0.300472
75%	7.554712	8.241504	7.554712	3.621145	2.814330	9.003281	3.101445	0.343396
max	2918.866000	3896.171016	2974.496152	129.783100	32.317103	787.081397	60.962412	0.343396

Figura 3.16: Tabla del resumen de resultados del dataframe de la banda roja.

El código de este capítulo fue escrito utilizando python 3.6.7 y paquetes numpy 1.17.3, scikit-image 0.16.2 y matplotlib 3.1.2, entre otros.

poner grafico del espectro de la lampara con colores facha y explicar que tipo de lampara es, escuchar audio hernan

Capítulo 4

**Spectral GUI y software del primer prototipo:
Integración clases del espectrómetro y de los
motores de thorlabs - Implementación con
Multithreading**

Capítulo 5

**Desarrollo XZStage y calibración - Desarrollo del
software integrando el arduino con algoritmos
asincrónicos**

Capítulo 6

**Montaje Microspectrómetro, caracterización
resolución espacial y calibración**

Capítulo 7

Integración cámara al microespectrómetro

Capítulo 8

Conclusiones

Capítulo 9

Trabajo a futuro

Referencias Bibliográficas

- [Adão et al., 2017] Adão, T., Hruška, J., Pádua, L., Bessa, J., Peres, E., Morais, R., and Sousa, J. (2017). Hyperspectral imaging: A review on uav-based sensors, data processing and applications for agriculture and forestry. *Remote Sensing*, 2017:1110.
- [Erdodan and Prabhat, 2012] Erdodan, T. and Prabhat, P. (2012). *Semrock Technical Note Series: Measurement of Optical Filter Spectra*. Semrock.
- [Grecco et al., 2016] Grecco, H. E., Imtiaz, S., and Zamir, E. (2016). Multiplexed imaging of intracellular protein networks. *Cytometry Part A*, 89(8):761–775.
- [Martínez-Usó et al., 2008] Martínez-Usó, A., Pla, F., Sotoca, J., and García-Sevilla, P. (2008). From narrow to broad band design and selection in hyperspectral images. volume 5112, pages 1091–1100.
- [Pose, 2017] Pose, A. (2017). Adquisición, procesamiento y análisis de imágenes hiperespectrales: de la microscopía de fluorescencia a la industria satelital. Master's thesis, UBA, Argentina. Director: Dr. Hernán Grecco.
- [Shah and Yager, 2017] Shah, K. G. and Yager, P. (2017). Wavelengths and lifetimes of paper autofluorescence: A simple substrate screening process to enhance the sensitivity of fluorescence-based assays in paper. *Analytical Chemistry*, 89(22):12023–12029. PMID: 29048155.