

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
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:

Jurade

Director:

Jurade

Profesora: Silvina Ponce Dawson

Jurade

Resumen

Resumen copado al final..

Índice

Resumen	iii
Índice	v
1 Introducción	1
1.1 Objetivo general	1
1.1.1 Objetivos específicos del proyecto	2
1.2 Introducción	2
1.3 Actividades y Metodología	8
1.4 Factibilidad	9
2 Primer prototipo del equipo y caracterización de los espectros de transmisión	11
3 Cuantificación de los defectos	13
3.1 Defectos de superficie de un componente óptico	13
3.1.1 MIL-PRF-13830: especificaciones de <i>scratch & dig</i>	14
3.1.2 ISO 10110-7: defectos de superficie	17
3.2 Características del filtro	19
3.3 Adquisición de las imágenes del filtro	21
3.3.1 <i>Tile scan</i>	23
3.3.2 Superficies y mapa de los defectos del filtro	24
3.3.3 Adquisición de imágenes individuales de cada banda espectral	28
3.4 Iluminación no uniforme del microscopio	30
3.5 Pre-procesamiento de las imágenes de cada banda espectral	34
3.5.1 Generación de la imagen de fondo: 	34
3.5.2 Normalización de las imágenes individuales del barrido de una banda con la imagen de fondo 	37
3.6 Criterio de elección del <i>threshold</i> 	40
3.7 Algoritmo de detección y cuantificación de los defectos 	42
3.8 Resultados del algoritmo de detección de los defectos de superficie 	48
3.8.1 Aplicación de las especificaciones técnicas	48
4 Desarrollo XZStage y calibración - Desarrollo del software integrando el arduino con algoritmos asincrónicos	53
5 Microespectrómetro	55
5.1 Diseño óptico del microespectrómetro	55

ÍNDICE

5.2 Montaje y alineación preliminar del microespectrómetro	55
5.3 Foco y resolución espacial del microespectrómetro	55
5.4 Integración de una cámara web	62
5.4.1 Mapeando el espectrómetro con la cámara	62
6 Conclusiones	63
7 Trabajo a futuro	65
Referencias Bibliográficas	67

Capítulo 1

Introducción

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

explicar microscopio, conceptos como apertura numérica.. espectroscopía un poco etc

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.

1.1 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

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.

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. 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.

■ 1.1.1 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.

■ 1.2 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).

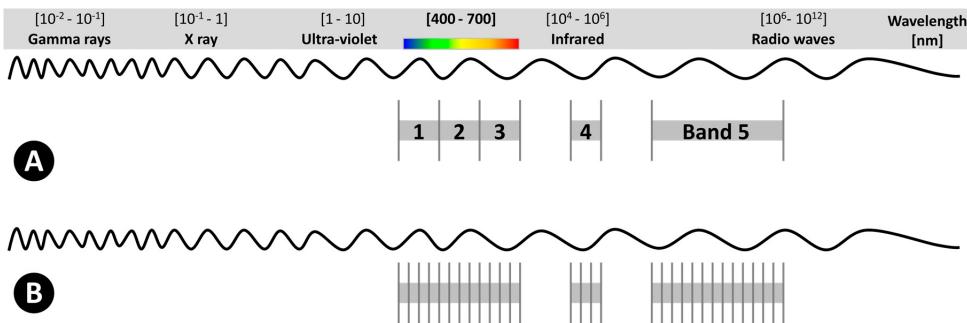


Figura 1.1: Representación de los espectros: (A) Multiespectral: 5 bandas anchas; y, (B) Hiperspectral: muchas bandas muy estrechas, generalmente entre cientos y miles de ellas. Los dibujos no se encuentran realizados a escala. Imagen tomada de [Adão et al., 2017].

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.

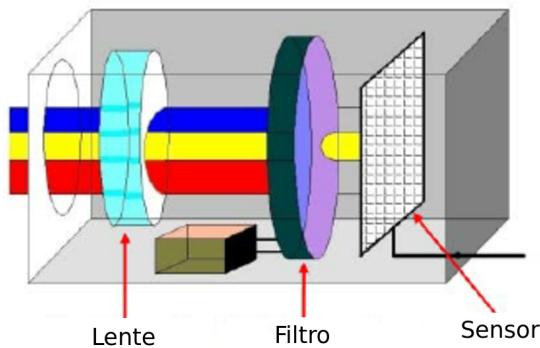


Figura 1.2: Esquema de una cámara hiperespectral. El filtro absorbe el espectro completo de la luz incidente salvo la bandapectral que el usuario determina, por lo que sólo las longitudes de onda elegidas atraviesan el filtro y son detectadas por el sensor. [Martínez-Usó et al., 2008]

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 $OD = -\log_{10}(T)$.

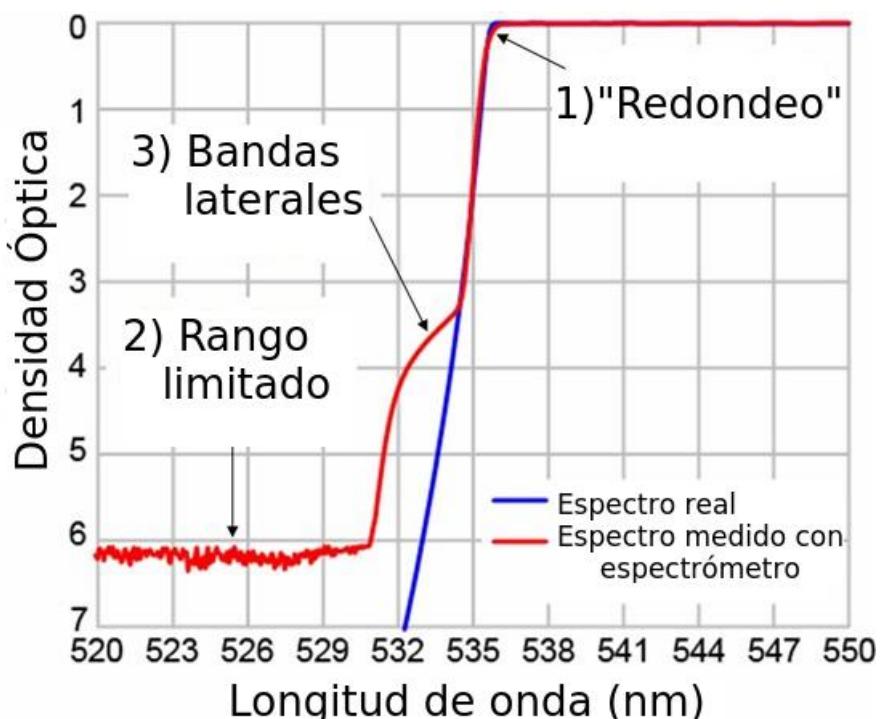


Figura 1.3: Discrepancias entre las mediciones experimentales con espectrómetros comerciales y el espectro "real" de un filtro óptico. Adaptado de [Erdodan and Prabhat, 2012].

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.

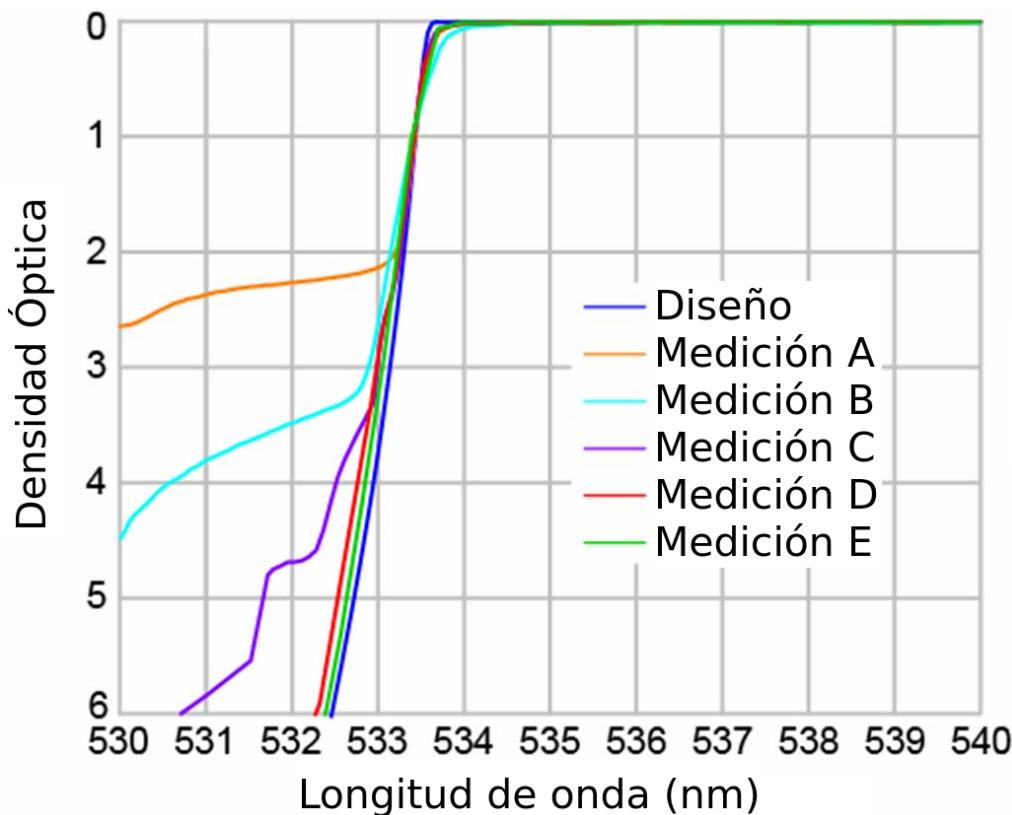


Figura 1.4: Distintas mediciones de la OD de un filtro LP03-532RE-25 RazorEdge de la empresa Semrock. Las mediciones fueron realizadas utilizando tanto espectrómetros comerciales como *custom-made* de la empresa con una variedad de arreglos experimentales que se explican en el texto. Adaptado de [Erdodan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

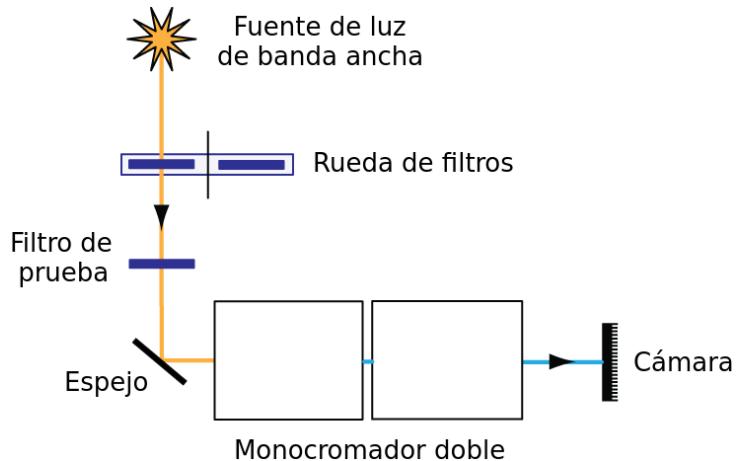


Figura 1.5: Diseño básico de un espectrómetro *custom-built* que utiliza una fuente de iluminación de banda ancha y permite la recolección de una amplia gama de longitudes de onda simultáneamente con un conjunto de detectores situados en la cámara. Este arreglo experimental permite una medición más rápida 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.

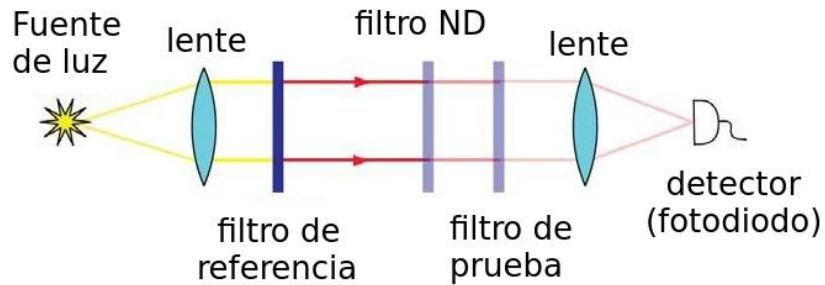


Figura 1.6: Arreglo experimental compatible con la producción industrial para medir valores de OD altos.

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.

1.3 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.

1.4 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 platina 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.

Observaciones generales del contenido de la tesis:

1. Introducción

- Los programas escritos son referenciados con un link al que se puede acceder haciendo click sobre el ícono de github: 

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 define qué es lo que se considera un defecto de un componente óptico y se muestran las características del filtro óptico utilizado en el presente trabajo. Se explica el proceso de adquisición de las imágenes microscópicas 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 banda, diámetro máximo, área cubierta por los defectos, etc. Finalmente, considerando las reglamentaciones vigentes en la industria, se explica la aplicación de los criterios de normas de calidad.

■ 3.1 Defectos de superficie de un componente óptico

Se define un defecto de superficie de un componente óptico de manera general como una imperfección localizada, es decir una ruptura de la homogeneidad de la superficie óptica [Gomez et al., 1998]. Estas imperfecciones consisten de rayaduras, hoyos, huecos, manchas, burbujas, entre otras consideradas en las especificaciones standard de la industria. La terminología varía dependiendo del sector de la industria óptica que se trate. En particular, en el presente trabajo se caracterizaron defectos de superficie denominados en adelante agujeros ó huecos (Ver Figura 3.1) y manchas ó defectos de transmisión (Ver Figura 3.2).

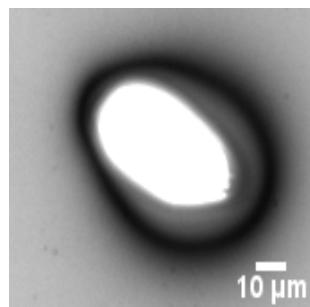


Figura 3.1: Defecto de superficie denominado agujero ó hueco, de $(62.83 \pm 0.59)\mu\text{m}$ de diámetro equivalente.

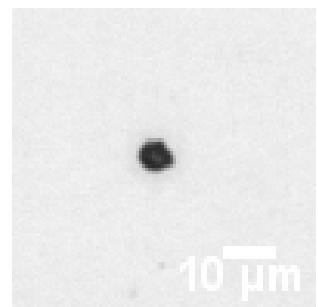


Figura 3.2: Defecto de superficie denominado mancha ó defecto de transmisión, de $(6.33 \pm 0.59)\mu\text{m}$ de diámetro equivalente.

Los defectos de superficie de un componente óptico pueden estar originados en el proceso de fabricación mismo, en el tratamiento y manipulación de la óptica (en inglés, *handling*) en distintas etapas de un proceso de montaje ó en el transporte del proveedor al cliente. Estos defectos pueden provocar un cambio de las propiedades ópticas del componente y en consecuencia los usuarios deben verificar la calidad óptica que los proveedores detallan en las especificaciones técnicas. A continuación se describen las dos especificaciones técnicas más utilizadas en la industria para determinar la calidad óptica de un componente, que son la *U.S. Military Performance Specification MIL-PRF-13830* y la ISO 10110 [Military, 1997][ISO, 2018]. Ambas especificaciones fueron indicadas en la hoja de datos del filtro analizado en el presente trabajo.

■ 3.1.1 **MIL-PRF-13830: especificaciones de *scratch & dig***

La especificación técnica MIL-PRF-13830 define un *scratch*(en adelante rayadura) como cualquier marca o rayadura de la superficie óptica del componente y un *dig*(en adelante, simplemente defecto) como cualquier otro defecto de superficie presente en la óptica, como por ejemplo el agujero ó hueco de la Figura 3.1 ó el defecto de transmisión ó mancha de la Figura 3.2. Esta reglamentación define las rayaduras y defectos permitidos en una superficie óptica utilizando una métrica dada por un par de números denominados *scratch and dig numbers*: S/D. El *scratch number* puede tomar alguno de los siguientes valores arbitrarios: 5,10,20,40,60,80, que representan en orden creciente el nivel de brillo de la rayadura. Este número no proviene de una medición experimental exacta, sino que es el resultado de comparar

el brillo de la rayadura del componente a analizar con muestras de rayaduras calibradas como las que se muestran esquemáticamente en la Figura 3.3, bajo ciertas condiciones de iluminación específicas (Ver *Inspection method's: 4.2.2.1 y 4.2.2. [Military, 1997]*).

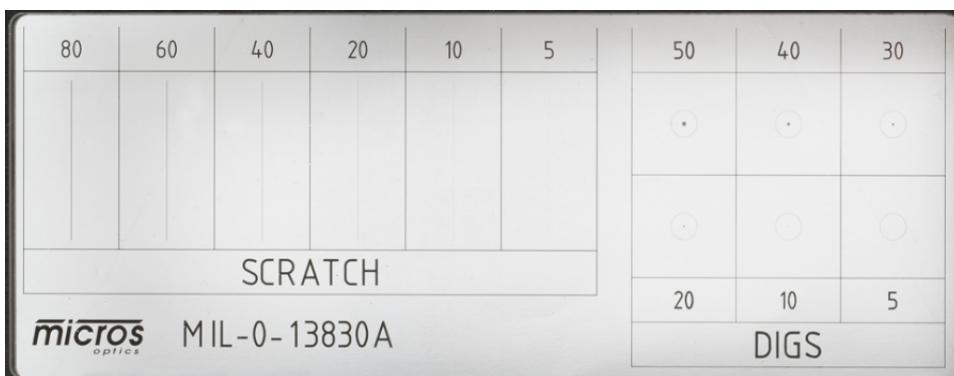


Figura 3.3: Muestra calibrada de *scratch & dig* comercializada por la empresa Thorlabs. Adaptado de <https://bit.ly/3bPSMYS>.

El *dig number* es el diámetro del defecto más grande permitido en el componente, dado en 1/100 de milímetros. Por ejemplo, un componente con un *dig number* de 40 implica que los defectos más grandes de la óptica pueden ser de un diámetro de hasta 0.4 mm. Si bien el *dig number* es una cantidad medible experimentalmente con por ejemplo un microscopio, también se utilizan muestras calibradas para determinar el tamaño y cantidad de los defectos (Ver Figura 3.3). Luego de que un inspector entrenado cuantifica todas las rayaduras y defectos de la óptica con las muestras calibradas, se verifica la calidad óptica del componente de acuerdo a los siguientes criterios:

- La suma de todas las longitudes de las rayaduras con el *scratch number* ($L_{S\#}$) asociado (máximo valor de brillo permitido) no podrá superar el valor de un cuarto del diámetro (Φ) de la óptica. Si el componente no tuviera una geometría circular, se considera el diámetro de un círculo con un área igual al de la óptica bajo análisis.

$$\sum L_{S\#} < \frac{\Phi}{4} \quad (3.1)$$

- El número total (N) de defectos con el *dig number* asociado (máximo diámetro de los defectos permitido) no podrá exceder el diámetro de la óptica dividido por 20 mm. De

obtenerse un número no entero, se trunca el resultado.

$$N < \frac{\Phi}{20mm} \quad (3.2)$$

- La suma de todos los diámetros (d) de los defectos deberá ser menor ó igual al doble del número total de defectos de diámetro máximo permitido (N) multiplicado por el *dig number* ($D_{\#}$) especificado en fracciones de milímetros.

$$\sum d \leq 2.N.D_{\#} \quad (3.3)$$

Así por ejemplo, una óptica de geometría circular con un diámetro de 200 mm y una calidad óptica especificada por el fabricante con *scratch and dig numbers S/D* 30-20, puede tener rayaduras con un brillo calibrado de 30 y la suma de todas las longitudes de las rayaduras de brillo 30 no podrá ser superior a los 50 mm (de acuerdo a (3.1)). Al mismo tiempo, la óptica no podrá tener más de 10 defectos de *dig number* igual a 20, es decir de tamaño máximo de 0.2 mm (de acuerdo a (3.2)) y la suma de los diámetros de todos los defectos no podrá ser superior a los 4 mm (de acuerdo a (3.3)).

La Figura 3.4 muestra una comparación de cuatro muestras de calibración de rayaduras, medidas bajo idénticas condiciones de iluminación [Aikens, 2010].

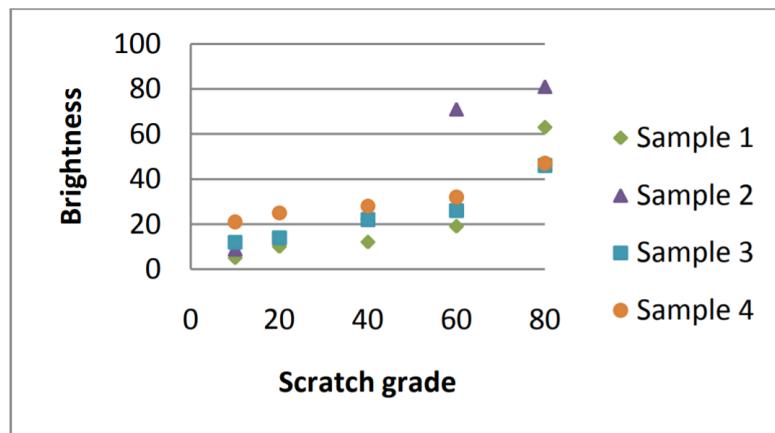


Figura 3.4: Brillo relativo de cuatro muestras calibradas de *scratch number*. *Sample* en inglés significa muestra. La muestra 1 es de la empresa FLIR/Brysen (S&D 1109), la muestra 2 es de Davidson Optronics (D-667A S/N 2431), la muestra 3 es de Eastman Kodak (*paddle* EKCO CM2) y la muestra 4 es de Jenoptik (*paddle* EO #53-157 CM1). La muestra 4 es vendida comercialmente por los proveedores Edmund Optics y por Thorlabs. Gráfico tomado de [Aikens, 2010].

De la Figura 3.4 se desprende que las cuatro muestras son incompatibles entre sí, es decir arrojan resultados de brillo distintos entre sí para un cierto *scratch number*. Se observa que para un *scratch number* igual a 10, el brillo de la muestra 4 es de mayor intensidad que el *scratch number* 60 de la muestra 1. Así también el brillo del *scratch number* 60 de la muestra 2 es más de dos veces más brillante que cualquiera de las otras muestras para este mismo *scratch number*.

Además, la métrica de *scratch & dig* tiene la falencia de no poder caracterizar ni rayaduras de brillo menores al *scratch number* igual a 5 ni defectos con un *dig number* menor a 5, es decir que no se consideran defectos de diámetro menores a los $50 \mu\text{m}$ [Turchette and Turner, 2012]. Esto es así pues esos números de *scratch & dig* son los valores más chicos presentes en las muestras calibradas para la inspección visual.

Si bien la métrica de *scratch and dig* sigue siendo ampliamente utilizada en la industria, el hecho de que el análisis de las rayaduras y defectos sea dependiente del inspector de turno sumado a que las muestras de brillo calibradas varían de acuerdo al fabricante de las mismas y que sólo sean considerados defectos con un diámetro mínimo de $50 \mu\text{m}$, hacen que estas especificaciones técnicas para determinar la calidad de una óptica resulten técnicamente ambiguas. A continuación se explican las especificaciones técnicas de la ISO 10110. Luego se muestran las características del filtro analizado en esta tesis junto a sus especificaciones ópticas de calidad.

3.1.2 ISO 10110-7: defectos de superficie

Las tolerancias de la normativa ISO 10110 vienen dadas por el número de defectos permitidos (N_p) y por un coeficiente dado en fracciones de milímetros denominado *grade number* (A_g) que es igual a la raíz cuadrada del área del defecto de diámetro máximo permitido. Estos dos valores son expresados en las hojas de datos de los componentes ópticos de la siguiente manera: $5/N_p \times A_g$. El número 5 hace referencia a que la especificación técnica dada se refiere a las tolerancias de los defectos de superficie (Parte 7 de la ISO 10110).

Se hace notar que si no es especificado en la hoja de datos del componente, el *grade number* incluye a cualquier tipo de defectos, rayaduras, etc y en ese sentido evita la ambigüedad de la

3. Cuantificación de los defectos

comparación con las muestras calibradas de brillo de las rayaduras. Ahora bien, la normativa establece que el control de calidad de los componentes puede ser realizado por inspección visual con muestras calibradas de defectos con distintos *grade numbers* (Ver MOTP-ISO ó EO # 59-154) y también incluye a la inspección automatizada de los defectos lo que resulta una novedad respecto de la normativa anterior. Sin embargo, de realizarse esto último la reglamentación establece que tiene que haber un acuerdo entre el fabricante y el cliente y que el equipamiento utilizado y las condiciones experimentales específicas para realizar el control de calidad tienen que estar especificadas en la hoja de datos del componente bajo análisis [Schöch et al., 2018].

Ahora bien, un componente óptico supera las especificaciones de la ISO 10110 mediante el método de inspección visual si supera las siguientes condiciones:

- No pueden existir defectos con un *grade number* mayor al especificado en la hoja de datos del componente.
- El área del componente óptico cubierta por defectos ‘relevantes’¹ ($A_{defectos}$) no puede superar el valor de la siguiente expresión:

$$A_{defectos} = N_p \cdot A_g^2 \quad (3.4)$$

Por ejemplo, la especificación 5/5x0.05 brindada por un cierto fabricante, indica que el componente cumple que tiene como máximo 5 defectos de *grade number* igual a 0.05 (diámetro de 50 micrones) y el área máxima cubierta por los defectos con un *grade number* mayor ó igual a 0.04 puede ser de $12500 \mu\text{m}^2$.

En esta sección se definió el concepto de defecto de superficie de un componente óptico como cualquier inhomogeneidad presente en la superficie bajo análisis. Se describieron las dos especificaciones técnicas más utilizadas para determinar la calidad óptica de la superficie de un componente, ambas presentes en la hoja de datos del filtro a analizar en la presente tesis.

¹Por defectos ‘relevantes’ se considera a los defectos de *grade number* mayor al defecto de mínimo *grade number* detectado vía inspección visual. De acuerdo a la ISO 14997 que es una implementación de los métodos de control de calidad especificados por la ISO 10110-7, el *grade number* del defecto más chico a considerar vía la inspección visual es de un *grade number* igual a 0.040 (40 μm de diámetro) [Etzold et al., 2016].

Por un lado, las especificaciones de *scratch & dig* que resultan un poco ambiguas debido a la determinación subjetiva de los *scratch numbers* del componente. Y, por otro lado, la ISO 10110 que propone superar esta ambigüedad no distinguiendo los tipos de defectos presentes en la óptica, sino tratándolos a todos por defectos en general por igual. En cualquier caso se hace notar que el control de calidad del componente óptico de interés por parte del cliente tiene que ser realizado bajo las mismas condiciones experimentales y utilizando el mismo criterio (teniendo un total acuerdo en la letra chica de cualquier especificación) que el proveedor.

A continuación se describen las características y dimensiones del filtro analizado en este trabajo y luego se describe el método de inspección del filtro implementado a partir de la adquisición de imágenes por transmisión con un microscopio.

3.2 Características del filtro

El componente óptico analizado en la presente tesis, denominado en adelante simplemente filtro, consiste de un arreglo de cinco filtros ópticos de interferencia considerados en adelante a cada uno de ellos como una banda. En la Figura 3.6 se muestra el filtro real analizado y en la Figura 3.5 se muestran las dimensiones especificadas por el fabricante.

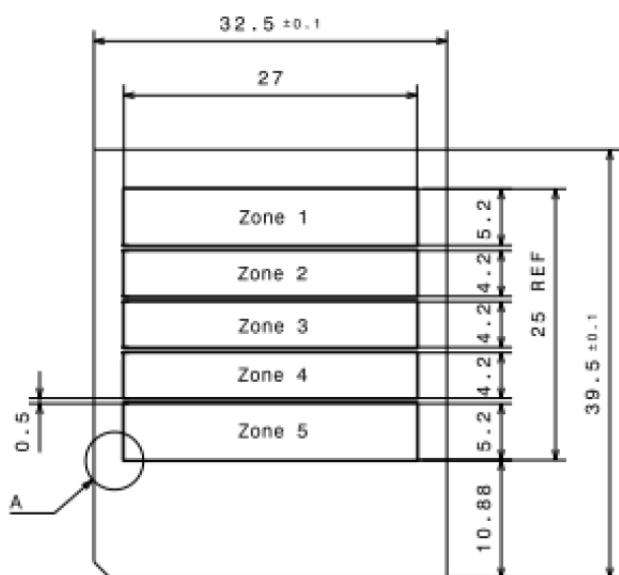


Figura 3.5: Dimensiones del filtro especificadas por el fabricante.



Figura 3.6: Imagen del filtro real analizado.

3. Cuantificación de los defectos

Las zonas (en inglés, *zone*) están asociadas a una cierta banda espectral de transmisión de la siguiente manera:

- Zona 1 - Banda Azul: (450-510) nm
- Zona 2 - Banda Verde: (510-580) nm
- Zona 3 - Banda Pancromática²: (450-750) nm
- Zona 4 - Banda Roja: (590-690) nm
- Zona 5 - Banda NIR³: (750-900) nm

Las especificaciones ópticas de calidad de cada banda del filtro brindadas por el fabricante son las siguientes:

5/2x0.063 (*according to MIL PRF 13830, S/D 20-10*)

Estas especificaciones implican para el caso de la ISO 10110, 5/2x0.063, que en la superficie óptica de cada banda puede haber un máximo de 2 defectos de *grade number* igual a 0.063 ($63 \mu\text{m}$ de diámetro), que no puede haber defectos con un *grade number* mayor a 0.063 y que el área total máxima cubierta por defectos de *grade number* mayor a 0.04 (diámetro de 40 μm) puede ser de $7938 \mu\text{m}^2$, de acuerdo a 3.4. Y, las especificaciones de *scratch & dig*, S/D 20-10, indican que en cada banda puede haber rayaduras con un brillo calibrado de *scratch number* igual 20 y que la suma de todas las longitudes de las rayaduras del mismo valor de *scratch number* no podrá ser superior al diámetro equivalente de cada banda, de acuerdo a 3.1. Por último, cada banda del filtro no deberá tener más de 1 defecto de *dig number* igual a 10 (diámetro de 100 μm) de acuerdo a 3.2 y la suma de los diámetros de todos los defectos no podrá ser superior a los 0.2 mm, de acuerdo a 3.3.

El proveedor indicó en la hoja de datos que utilizó una *target value*(?) con especificaciones ISO 10110, 5/1x0.04 y de S/D 10-5. El fabricante no aclaró el método de inspección utilizado para garantizar la calidad óptica especificada del filtro.

²La palabra pancromática, del griego ático donde pan significa todo y cromático viene de la familia de la palabra color, implica que dicha banda tiene un espectro de transmisión en toda la región del visible.

³NIR, 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.

Se hace notar que entre las bandas se encuentran unas regiones rectangulares de cromo, de $(0.5 \pm 0.1)mm$ de largo como se muestra en la Figura 3.5. El mismo material cubre toda la región del filtro no contenida por las cinco bandas.

A continuación se describe el proceso de adquisición de las imágenes del filtro, posteriormente su procesamiento y el algoritmo de detección de los defectos y por último se discute un análisis cuantitativo de los mismos.

3.3 Adquisición de las imágenes del filtro

Con el propósito de cuantificar y caracterizar los defectos del filtro se adquirieron imágenes microscópicas del mismo. Para la adquisición de las imágenes se utilizó un microscopio invertido Zeiss Axio Observer Z1 como se muestra en la Figura 3.7, con un objetivo Zeiss N-Achroplan de magnificación 10X y apertura numérica de 0.25.



Figura 3.7: Microscopio invertido Zeiss Axio Observer Z1.

Las imágenes del filtro fueron adquiridas por transmisión utilizando una fuente de luz blanca, en condiciones de *bright field*⁴. Se montó el filtro sobre el portamuestras de la platina

⁴Técnica de iluminación que en castellano suele ser denominada de 'campo brillante' para diferenciarla de la iluminación de campo oscuro (en inglés *dark field*, ver W).

3. Cuantificación de los defectos

del microscopio como se muestra en la Figura 3.8 y mirando por el ocular se puso en foco la superficie del filtro a medir.

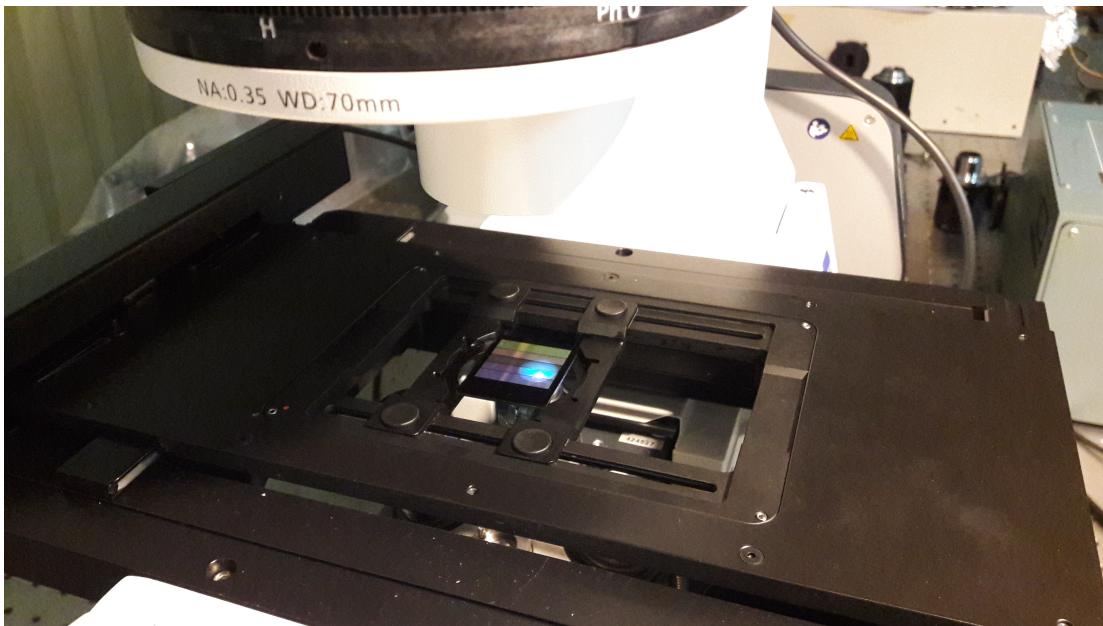


Figura 3.8: Montaje del filtro sobre el portamuestras de la platina del microscopio.

La cámara monocromática del microscopio del fabricante Zeiss, modelo Axiocam 702, con un sensor CMOS de 1/1.2" (diagonal de 13.3mm) y una resolución de 2.3 megapíxeles (1216x1920 píxeles), 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 para la configuración utilizada, donde las medidas de 1 píxel equivalen a $0.586 \mu\text{m} \times 0.586 \mu\text{m}$. Cada *tile* individual tiene las dimensiones del *field of view* (FOV⁵) de la cámara, que son de $713 \mu\text{m} \times 1125 \mu\text{m}$.

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.

⁵En 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.

3.3.1 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 NIR ó para cada banda espectral del filtro en particular.

La palabra en inglés *tile* significa baldosa 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) que se tiene del arreglo óptico de la cámara integrada al microscopio. En la Figura 3.9 se muestra un ejemplo de un *tile scan* de la banda pancromática del filtro.

Existen 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 selección visual individual de las cuatro esquinas de la misma, es decir las posiciones $[0,0]$, $[xf,0]$, $[0,yf]$, $[xf,yf]$ de acuerdo al sistema de coordenadas de la Figura 3.9. Para elegir estas esquinas el microscopio cuenta con un *joystick* que permite mover la platina motorizada del microscopio en el plano de la imagen y se tiene activada la adquisición en vivo en el software ZEN para elegirlas visualmente.

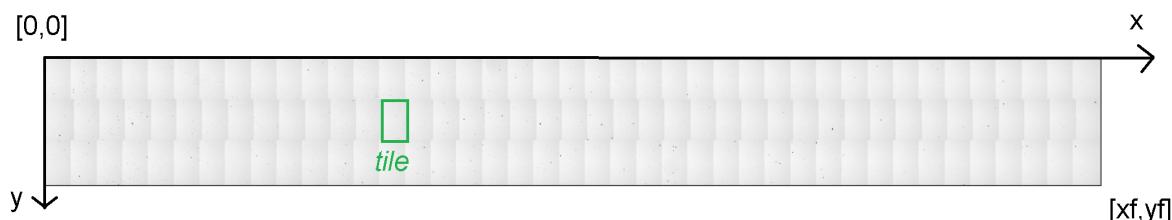


Figura 3.9: *Tile scan* de la banda pancromática.

Cada trayectoria del barrido fue realizada automáticamente de la siguiente manera: la platina motorizada se posicionó en el centro del FOV de la primera *tile* a adquirir asociada a las coordenadas $[0,0]$ de la imagen de la Figura 3.9 y se adquirió la primera imagen individual del barrido completo de la región a adquirir, en este ejemplo la banda pancromática. A continuación la platina motorizada se desplazó en el sentido definido positivo del eje x hasta el centro del FOV de la segunda *tile* a adquirir teniendo en cuenta el *overlap* configurado y así

3. Cuantificación de los defectos

siguiendo una trayectoria que barre por ‘filas’ completas a lo largo del eje x que van variando con el desplazamiento discreto vertical en el eje y cuando se llega a los extremos del eje x.

Entre otros parámetros del barrido, se eligió el *overlap* entre las baldosas, es decir la superposición entre las mismas que luego permite obtener una imagen completa individual para su visualización, realizando un *stitching*⁶ como post-procesamiento de las imágenes. Este último procedimiento 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 de la imagen la menor cantidad de defectos posibles. Por último, se elige en la configuración que cada baldosa de la región barrida sea exportada como una imagen individual para su posterior análisis.

3.3.2 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 3.10 y 3.11.

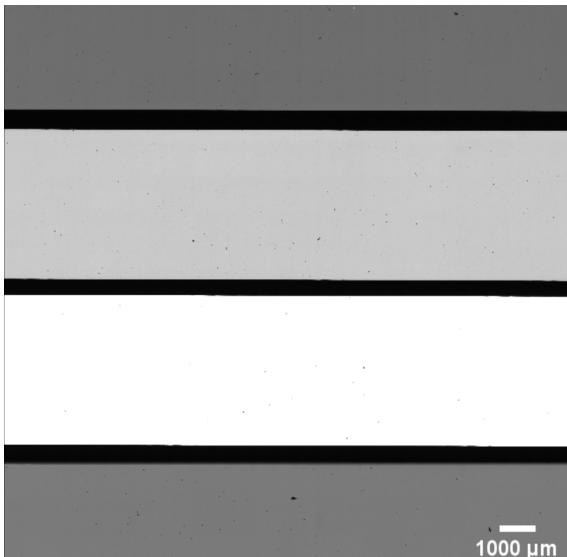


Figura 3.10: Imagen de la superficie exterior A del filtro, para un barrido de 15.54 mm x 14.94 m.

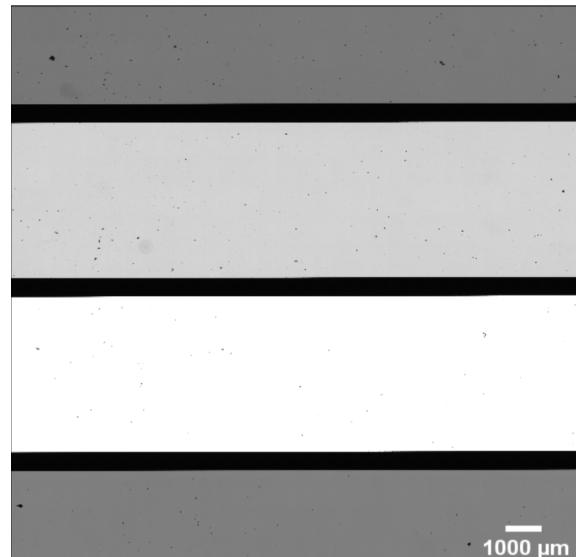


Figura 3.11: Imagen de la superficie exterior B del filtro, para un barrido de 15.50 mm x 15.55 mm.

⁶El *stitching* es el proceso computacional por el cual se combinan múltiples *tiles* para producir una sola imagen que permita una mejor visualización (Ver técnica SIFT (*Scale Invariant Feature Transform*), [Lowe, 1999]).

Las dos superficies exteriores denominadas arbitrariamente A y B son las que se muestran especificadas en la Figura 3.12 y que se encuentran en la interfaz filtro-aire. En las Figuras 3.10 y 3.11 se muestran las bandas espectrales del filtro en orden descendente: Azul (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.



Figura 3.12: Dimensiones del espesor del filtro: (1.0 ± 0.1) mm. Las superficies exteriores del filtro son las superficies A y B, que se encuentran en la interfaz filtro-aire.

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 sature 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 puede ver en el histograma de la intensidad de los píxeles de la Figura 3.13 para el barrido de la superficie A del filtro.

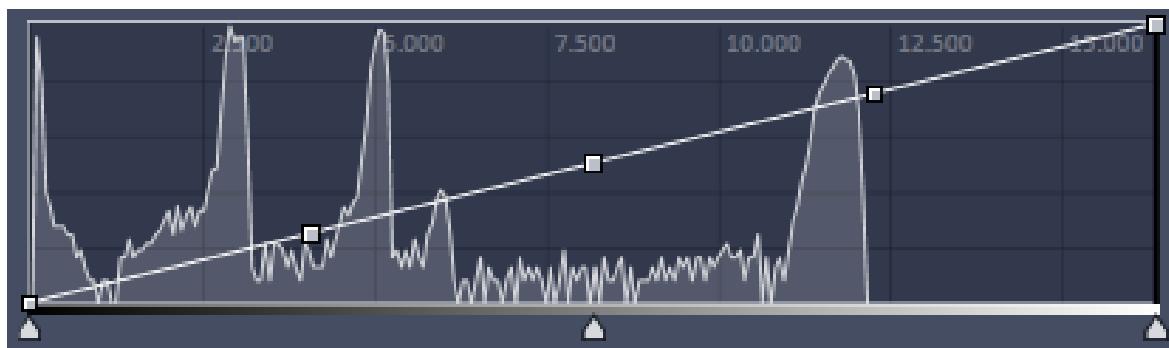


Figura 3.13: Histograma de la intensidad de los píxeles de la cámara del barrido de la superficie exterior A del filtro que se observa en el software ZEN del microscopio.

3. Cuantificación de los defectos

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 de adquisición de la cámara fijados para que ninguna de las bandas del filtro saturé, no era posible obtener una imagen de 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 [Zeiss, 2016], del gráfico de la eficiencia cuántica⁷ se desprende que para la regiónpectral del NIR tiene una eficiencia cuántica menor al 30% (Ver Figura 3.14). A esto se le suma el hecho de que la fuente de luz tiene un espectro de emisión centrada en el ultravioleta y con una fuerte componente del espectro visible pero de relativa poca intensidad en la región del NIR, como se muestra en el gráfico de la intensidad en función de la longitud de onda de la Figura 3.15. Dicho espectro fue medido con el espectrómetro CCS200 de Thorlabs.

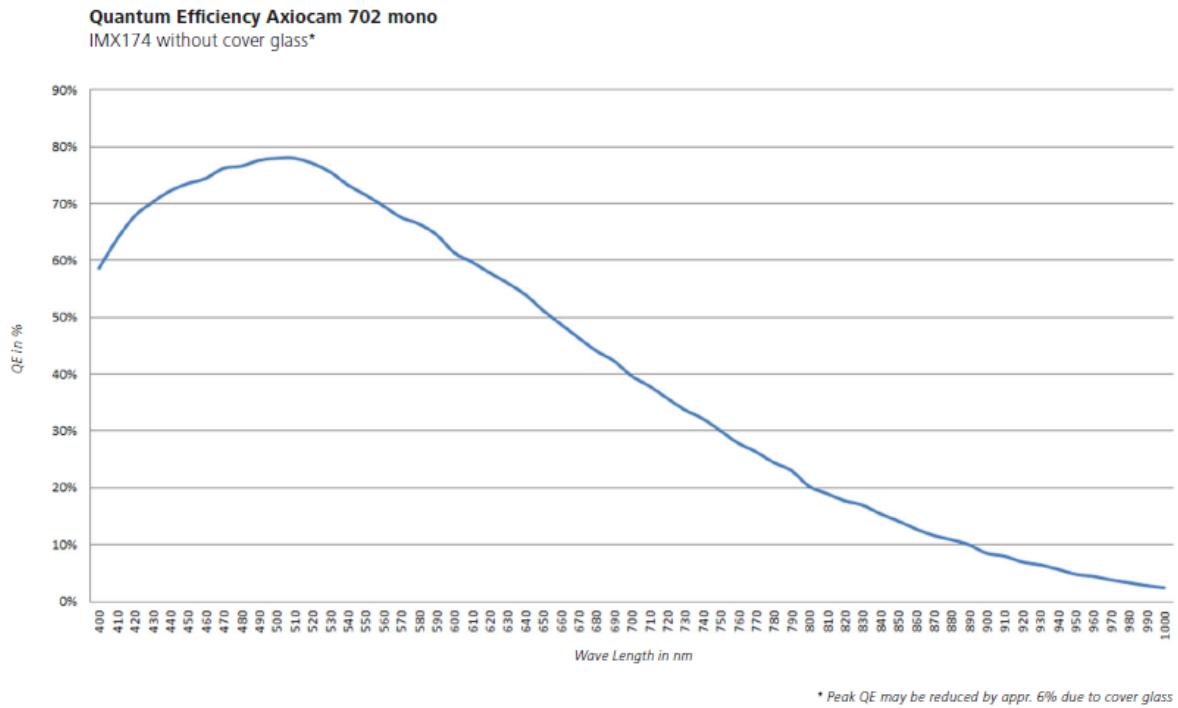


Figura 3.14: Gráfico de la eficiencia cuántica de la cámara monocromática del microscopio Axiocam 702 en función de la longitud de onda.

⁷La 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.

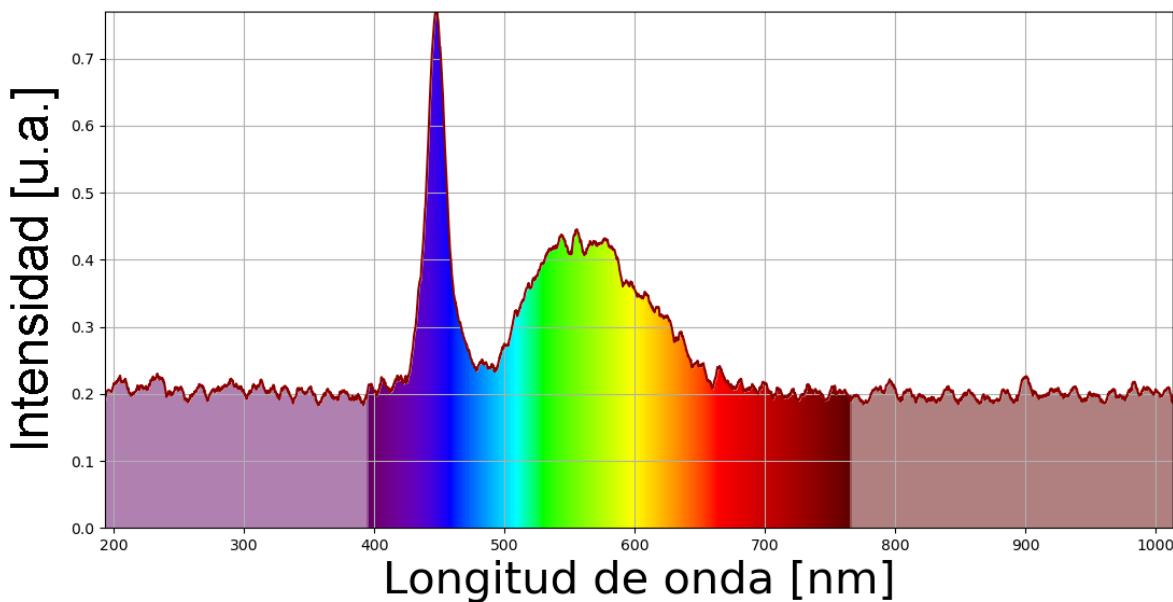


Figura 3.15: Espectro de emisión de la fuente de luz del microscopio.

Ahora bien, la banda espectral 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 por una que tenga una mayor intensidad en dicha región espectral.

La imagen completa de cada superficie exterior del filtro permitió:

- Realizar un primer diagnóstico visual general por imagen de la calidad óptica de construcción del filtro.
- 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 3.10 y 3.11, 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 para ser utilizado luego con el microespectrómetro (Ver Capítulo 5).

A continuación se explica el proceso de adquisición de las imágenes individuales de cada banda espectral, el pre-procesamiento de las mismas que consiste en la corrección de la

iluminación no uniforme del microscopio y luego se describe el algoritmo de detección de los defectos.

3.3.3 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 el posterior análisis de cada banda. Así también se verificó que las cuatro esquinas de la banda a medir estuvieran en foco a partir de la visualización en vivo de la cámara. Dichas esquinas fueron elegidas en el software para determinar el área a ser barrida con el *tile scan* teniendo cuidado de no incluir parte del cromo en el campo de visión de la imagen. Esto resultó importante pues de lo contrario el algoritmo de detección de los defectos detectaba al cromo como un centenar de defectos, que serían falsos positivos de defectos, lo que arruinaría claramente cualquier tipo de análisis cuantitativo. En las Figuras 3.16, 3.17, 3.18, 3.19 y 3.20 se muestran los *tile scan* de cada banda y en sus epígrafes se detallan los parámetros de cada adquisición.

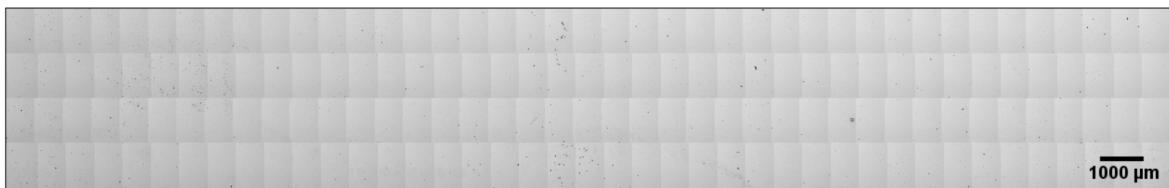


Figura 3.16: Imagen de la banda azul del filtro obtenida mediante un *Tile scan* de 26.37 mm x 4.16 mm, compuesta por 164 *tiles*, con la intensidad de la lámpara configurada en 30% y el tiempo de exposición de la cámara fue de 40 ms.



Figura 3.17: Imagen de la banda verde del filtro obtenida mediante un *Tile scan* de 26.37 mm x 3.15 mm, compuesta por 123 *tiles*, con la intensidad de la lámpara configurada en 17% y el tiempo de exposición de la cámara fue de 40 ms.



Figura 3.18: Imagen de la banda roja del filtro obtenida mediante un *Tile scan* de 26.37 mm x 3.15 mm, compuesta por 123 *tiles*, con la intensidad de la lámpara configurada en 10% y el tiempo de exposición de la cámara fue de 40 ms.



Figura 3.19: Imagen de la banda pancromática del filtro obtenida mediante un *Tile scan* de 27.65 mm x 4.16 mm, compuesta por 124 *tiles*, con la intensidad de la lámpara configurada en 27% y el tiempo de exposición de la cámara fue de 15 ms.

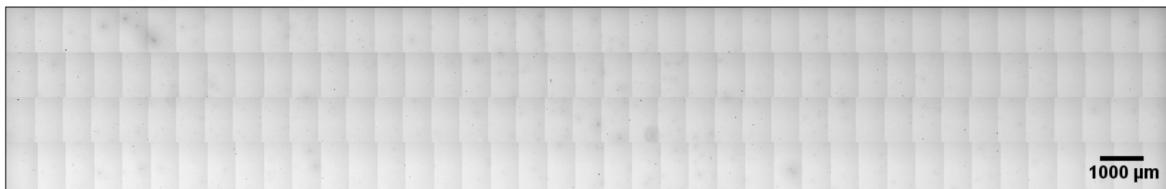


Figura 3.20: Imagen de la banda NIR del filtro obtenida mediante un *Tile scan* de 26.37 mm x 4.16 mm, compuesta por 164 *tiles*, con la intensidad de la lámpara configurada en 50% y el tiempo de exposición de la cámara fue de 150 ms.

A continuación se explican algunas consideraciones importantes que se tuvieron respecto de los formatos de las imágenes y de los tipos de datos así como su precisión:

- Cada barrido completo de una banda es guardado por el software de Zeiss en un archivo de extensión .czi que contiene toda la *metadata* como la información referida a la configuración del microscopio utilizada. Dicho archivo puede ser manipulado con el software de Zeiss, ó con el Fiji-ImageJ (tiene más herramientas que el software ImageJ a secas) ó a través del lenguaje *python* utilizando la librería *czifile* (Ejemplo sencillo: [Q](#)).
- El archivo .czi de la banda completa además contiene todas las *tiles* del barrido que pueden ser exportadas como archivos individuales utilizando las herramientas de procesamiento del software de Zeiss [Zeiss, 2014]. Es muy importante exportar dichas imágenes eligiendo

un formato de imagen que no modifique la calidad de la imagen original, esto es, que no se pierda precisión sobre los valores de intensidad de cada píxel.

- Se recomienda para el guardado, manipulación, operaciones, etc., utilizar el formato de imagen TIFF (*Tagged Image File Format*) pues es un formato que guarda los datos de intensidad de cada píxel originales, sin pérdida de precisión por compresión. Y, definitivamente no se puede utilizar el formato de imagen JPEG (*Joint Photographic Experts Group*) en el campo de la microscopía pues el tipo de compresión que realiza sobre los datos originales resulta en una pérdida de precisión.
- Por último, se hace notar que la pérdida de precisión de una imagen puede ocurrir tanto en el guardado como en las operaciones sobre las imágenes. Un ejemplo de esta pérdida de precisión sería convertir las imágenes de una precisión original de 16 bits ($2^{16} = 65536$ posibles valores de intensidad) a una precisión de 8 bits ($2^8 = 256$). Este inconveniente podría ser producido automáticamente por ejemplo en alguna operación utilizando la librería *scikit-image* [Van der Walt et al., 2014], por lo que se sugiere controlar la precisión con la que se manipulan las imágenes en cada operación realizada.

La eficiencia en la aplicación de un algoritmo de segmentación⁸ de defectos en las imágenes individuales de cada banda adquiridas depende fuertemente de la distribución de los valores de intensidad de una imagen que permiten distinguir a los defectos del fondo de la imagen. A continuación se da una breve explicación sobre las consecuencias de una iluminación no uniforme del microscopio sobre una muestra y como esto repercute en la detección posterior de los defectos. Luego se explica el procesamiento de las imágenes realizado para obtener la cuantificación de los defectos de cada banda del filtro.

3.4 Iluminación no uniforme del microscopio

Las imágenes microscópicas pueden estar corrompidas por las variaciones de intensidad debido a las imperfecciones inherentes del proceso de formación de imágenes. Estas variaciones de intensidad pueden venir dadas por la iluminación no uniforme de la muestra, por la

⁸En el contexto de la presente tesis, el término segmentación hace referencia a la identificación individual de cada defecto presente en una imagen.

orientación misma de la muestra al montarla sobre la platina del microscopio ó por el efecto de *vignetting* (la aparición de bordes negros en las imágenes) propio de la configuración del sensor de la cámara. Estos efectos pueden dar lugar a falsos positivos⁹ en el proceso de segmentación de los defectos, lo que constituye un grave problema a solucionar.

La desalineación de alguno de los componentes que se encuentran en el camino óptico entre la fuente de luz y el sensor de la cámara con el que se adquieren las imágenes (Ver Figura 3.21), es una causa muy importante de la iluminación no uniforme de la muestra que se está analizando. En la Figura 3.22 se puede observar un ejemplo de una imagen microscópica adquirida con una iluminación no uniforme.

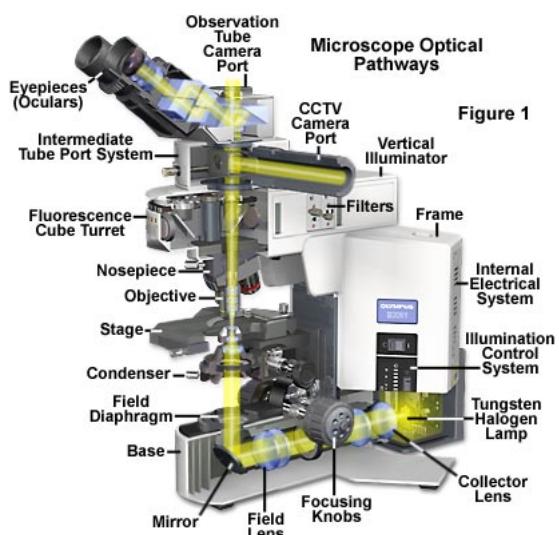


Figure 1

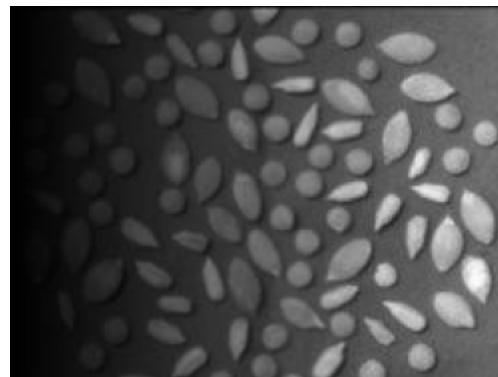


Figura 3.21: Camino óptico de la luz desde su fuente de emisión hasta la detección en el sensor de una cámara digital. Adaptado de <https://bit.ly/2xrh8Jh>

Figura 3.22: Ejemplo de imagen microscópica con una iluminación no uniforme.

Una imagen microscópica adquirida idealmente con una iluminación uniforme perfecta tendría una imagen de fondo (*background image*) como la que se muestra en la Figura 3.23. La imagen de fondo es una imagen que contiene en cada píxel la información de la iluminación del microscopio bajo ciertas condiciones de intensidad de la fuente de luz y del tiempo de integración del sensor de la cámara utilizado. Experimentalmente, dicha imagen puede ser obtenida colocando un portaobjeto sin la muestra, en las mismas condiciones de iluminación

⁹En el contexto de esta tesis, un falso positivo consistiría en la detección errónea mediante un algoritmo de procesamiento de imágenes de un defecto que en realidad no lo es.

3. Cuantificación de los defectos

y foco (misma distancia muestra-objetivo). Si dicha imagen de fondo experimental no pudiera ser adquirida pero se cuenta con un gran número de imágenes bajo las mismas condiciones experimentales, una imagen de fondo puede ser generada tomando la mediana del conjunto de imágenes como se explica más adelante.

Para medir la uniformidad de la iluminación se utilizan los histogramas de las imágenes. Una imagen monocromática es manipulada computacionalmente como una matriz donde cada elemento de la matriz representa el valor de intensidad de dicho píxel asociado. El histograma de una imagen es la representación de la distribución de intensidad de la misma y se lo define como el número de píxeles presentes en una imagen con un cierto valor de intensidad.

En la Figura 3.23 se muestra una imagen de fondo ficticia que tendría una iluminación ideal uniforme y sin problemas de *vignetting*. Dicha imagen tiene un histograma como el que se muestra en la Figura 3.24, en el que se puede observar que todos los píxeles de la imagen tienen el mismo valor de intensidad, lo que demuestra que el fondo es perfectamente homogéneo.

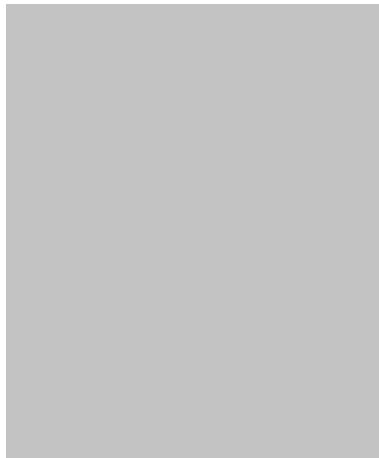


Figura 3.23: Imagen de fondo con una iluminación uniforme ideal y sin problemas de *vignetting*.

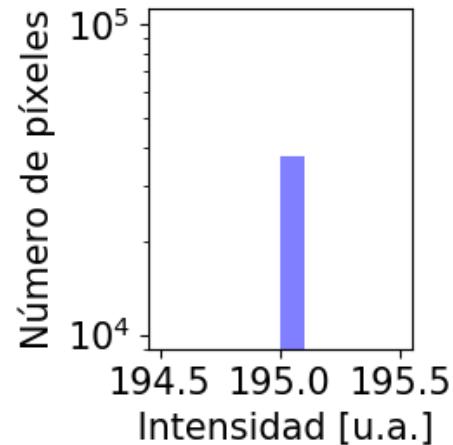


Figura 3.24: Histograma de la intensidad de los píxeles de la imagen de fondo ideal.

En adelante, el fondo de cada imagen será denominado el *background* de la imagen, para diferenciarlo de los defectos que se encuentran en lo que en adelante se llamará el *foreground* de la imagen. Para resaltar la importancia de la corrección de la iluminación no uniforme y del *vignetting*, supongamos una imagen ficticia de alguna banda del filtro analizado en la

presente tesis, adquirida con una iluminación de fondo uniforme ideal y sin problemas de *vignetting*, donde se puedan observar dos defectos (en color negro).

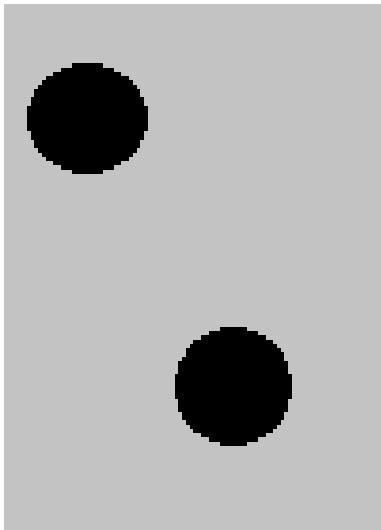


Figura 3.25: Imagen con dos defectos con una iluminación uniforme ideal y sin problemas de *vignetting*.

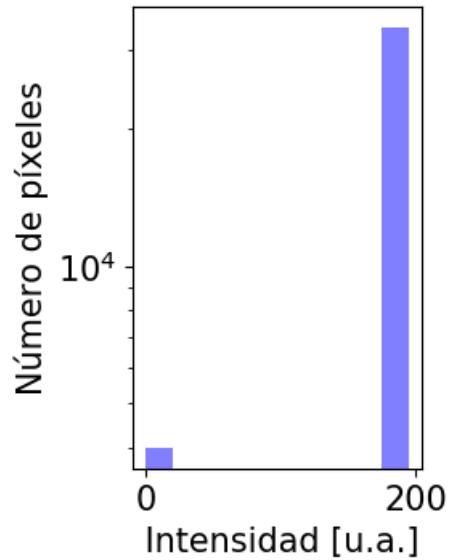


Figura 3.26: Histograma de la intensidad de los píxeles de la imagen con dos defectos con una iluminación uniforme ideal y sin problemas de *vignetting*.

En la Figura 3.26 se muestra el histograma de la intensidad de los píxeles de la imagen con dos defectos con una iluminación uniforme ideal y sin problemas de *vignetting*. En dicho histograma se distingue de forma binaria el *foreground* (defectos) con valores de intensidad iguales a 0, del *background* con valores de intensidad iguales a 195. Bajo estas condiciones ideales, la segmentación de los defectos puede ser realizada de inmediato eligiendo cualquier umbral de intensidad que se encuentre entre el *foreground* y el *background*.

A continuación se explica el análisis computacional de las imágenes individuales de cada banda realizado desde su pre-procesamiento, la segmentación posterior y finalmente la cuantificación de los defectos.

3.5 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 completa¹⁰, de tamaños típicos de 1 GB ó del filtro completo que tienen más de 5 GB.

El pre-procesamiento de las imágenes individuales de cada banda espectral consistió en la corrección de la iluminación no uniforme del microscopio que se realiza normalizando las imágenes individuales del barrido con una imagen de fondo [Nordenfelt et al., 2018]. Este pre-procesamiento consistió de las siguientes dos etapas que se explican a continuación:

1. Generación de la imagen de fondo.
2. Normalización de las imágenes individuales del barrido de una banda con la imagen de fondo.

3.5.1 Generación de la imagen de fondo:

Se construyó computacionalmente la imagen de fondo de cada banda a partir de tomar la mediana para cada píxel de todas las imágenes individuales adquiridas de la banda. Esta imagen de fondo contiene la información de la no uniformidad de la iluminación del microscopio. Dicha imagen debe ser generada para cada banda en particular ya que cada una de las bandas fue adquirida en ciertas condiciones de intensidad de la fuente de luz y del tiempo de integración de la cámara.

En la Figura 3.27 se muestra la imagen de fondo generada para la banda azul, 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

¹⁰Vale aclarar que las imágenes completas ya sea de una banda ó las del filtro completo, fueron el resultado de realizar un *stitching* de todas las *tiles* individuales de cada adquisición y, fueron procesadas de esta manera simplemente para optimizar su visualización pero no para realizar el análisis ni detección de defectos sobre las mismas.

alguna reflexión no deseada en el microscopio, ya advertida por otros usuarios del equipo. Dichos discos fueron observados en la adquisición de las cinco bandas.

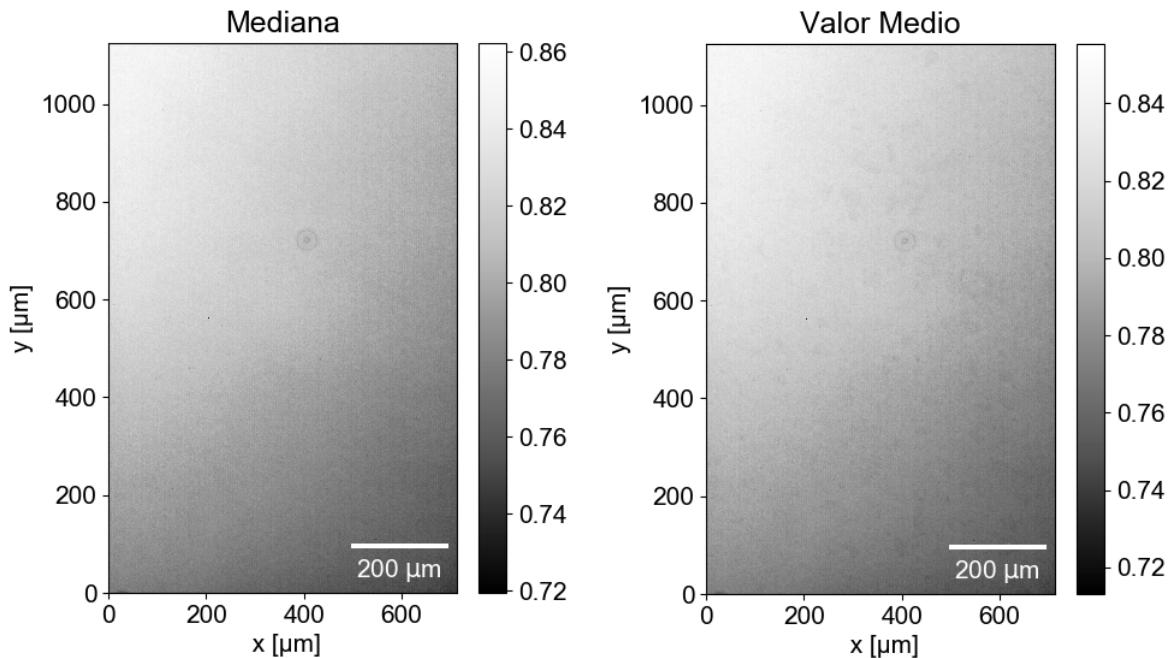


Figura 3.27: Imagen de fondo de la banda azul del filtro obtenida tomando la mediana para cada píxel de todas las imágenes del barrido.

Figura 3.28: Imagen de fondo de la banda azul del filtro obtenida tomando el valor medio para cada píxel de todas las imágenes del barrido.

Al mismo tiempo, se observa en la imagen de fondo de la Figura 3.27 que la iluminación del microscopio no es idealmente uniforme sino que presenta un rango de valores de intensidad que contienen píxeles más brillantes (extremo superior izquierdo) en conjunto con píxeles más oscuros (extremo inferior derecho). Esto último puede ser el efecto de alguna desalineación de la configuración del microscopio.

En la Figura 3.29 se muestran los histogramas de la intensidad de los píxeles de las imágenes de fondo generadas a partir de tomar la mediana y el valor medio. En la misma figura se graficaron las curvas de densidad estimadas a partir de los datos originales. Se observa que la imagen de fondo generada con el valor medio tiene una mayor cantidad de píxeles más oscuros que la imagen de fondo generada con la mediana. Los valores atípicos (en inglés *outliers*) de intensidad influencian enormemente el valor medio de los datos. Dichos *outliers* pueden observarse como manchas presentes en la imagen de fondo generada a partir del

valor medio de la Figura 3.28 y en la curva de densidad esto se refleja en el hecho de que la curva del valor medio tiene una mayor concentración en valores de intensidades más chicos que la curva de la mediana. Ahora bien, la curva de densidad de la imagen de la mediana muestra que la generación de la imagen de fondo tomando la mediana es una forma exitosa de evitar incluir los *outliers* en la imagen. Resulta fundamental deshacerse de estos *outliers* en la imagen de fondo para no corromper las imágenes individuales originales del barrido. Esto es, si se utilizara la imagen de fondo del valor medio para corregir la iluminación no uniforme en las imágenes individuales, las mismas tendrían luego los *outliers* presentes lo cual sería catástrofico.

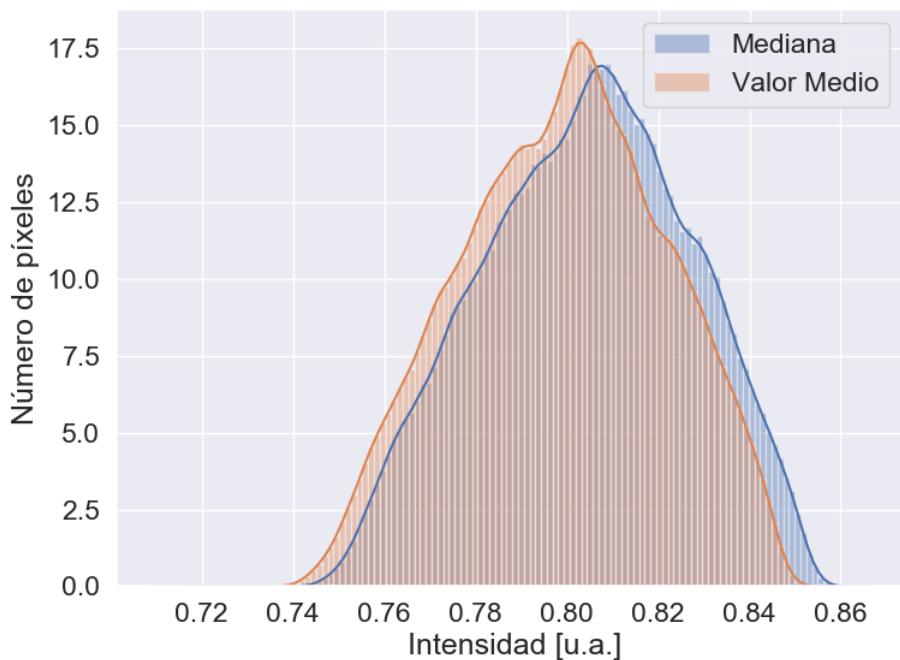


Figura 3.29: Histogramas de las imágenes de fondo de la banda azul del filtro generadas a partir de tomar el valor medio y la mediana para cada píxel del conjunto de imágenes de la banda. Se graficaron simultáneamente las curvas de distribución estimadas a partir de los datos de las imágenes. El eje vertical se encuentra normalizado por el máximo valor de la frecuencia de píxeles para un cierto valor de intensidad.

Se hace notar por un lado que para generar la imagen de fondo se utilizaron las imágenes originales de cada banda y que al ser manipuladas en el lenguaje de programación *python* para tomarles la mediana, dichas imágenes fueron tratadas como matrices donde cada elemento de matriz contenía un valor numérico cuyo tipo de dato computacional era un entero sin signo de 16 bits de precisión, es decir un número entre 0 y 65536. Dichos valores son tratados como

números de punto flotante, con una precisión de 64 bits al momento de tomar la mediana para cada píxel del conjunto de imágenes. En consecuencia la imagen de salida tiene la misma precisión y los valores de intensidad son reescalados al intervalo comprendido entre 0 y 1.

A continuación se explica el proceso de corrección de la iluminación no uniforme del microscopio en las imágenes individuales de cada banda adquirida.

3.5.2 Normalización de las imágenes individuales del barrido de una banda con la imagen de fondo

Con la imagen de fondo de cada banda ya construida, se normalizaron las imágenes originales del barrido completo de cada banda[Nordenfelt et al., 2018] con el objetivo de corregir la iluminación no uniforme del microscopio y para eliminar la reflexión no deseada del objetivo del microscopio presente en todas las imágenes (discos concéntricos de la imagen b) de la Figura 3.27).

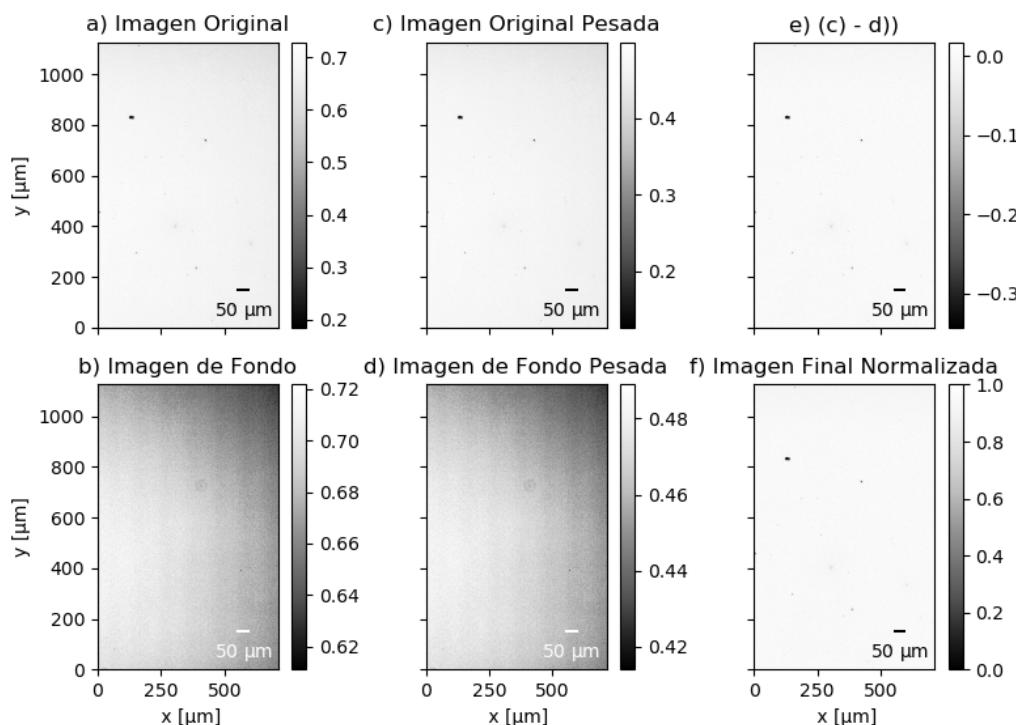


Figura 3.30: Imágenes del proceso de corrección de la iluminación no uniforme. a) Imagen original individual de la banda NIR. b) Imagen de fondo de la banda NIR. c) Imagen original multiplicada por el valor medio de la imagen de fondo. d) Imagen de fondo multiplicada por el valor medio de la imagen original. e) Imagen resultante de la diferencia entre las imágenes c) y d). e) Imagen final normalizada resultado de la expansión del histograma de intensidades.

En la Figura 3.30 se muestran las operaciones del proceso de normalización de una imagen individual (*tile*) del barrido completo de la banda NIR. El mismo proceso fue realizado para cada imagen individual de cada banda adquirida de acuerdo a las siguientes operaciones:

- Se calculó el valor medio de la intensidad de la imagen de fondo (*bg_img*, ver imagen b) y de la imagen individual (*tile_img*, ver imagen a)) de una banda a normalizar. Esto es, se calculó la media aritmética de todos los elementos de matriz que representan a cada imagen, que es el resultado de la división entre la suma de todos los elementos de la matriz y el número total de los mismos.
- Se multiplicó la imagen de fondo por el valor medio de la imagen individual y viceversa, es decir:

$$bg_pes = \text{mean}(tile_img) \cdot bg_img \quad (3.5)$$

$$tile_pes = \text{mean}(bg_img) \cdot tile_img \quad (3.6)$$

, donde *bg_pes* (Ver imagen d)) y *tile_pes* (Ver imagen c)) son la imagen de fondo y la imagen individual pesadas con la contribución del valor medio de la imagen correspondiente.

- Se corrigió la iluminación no uniforme de la imagen original (Ver imagen e)), cuya imagen resultante se la denomia *dif*:

$$dif = tile_pes - bg_pes \quad (3.7)$$

- Finalmente, para maximizar el contraste de la imagen, es decir para aumentar la variación de los valores de intensidad de la imagen, se realizó la expansión del histograma ([Jain, 1989]) que consiste en una transformación lineal para expandir el intervalo comprendido entre los valores mínimo y máximo de intensidad presentes en la imagen, a todo el rango posible entre 0 y 1 (Ver Ecuación 3.9). Para ello, se definió el mínimo valor de la intensidad en 0 (en un rango de valores de intensidad entre 0 y 1, con precisión de 64 bits):

$$\min_dif = dif - \min(dif) \quad (3.8)$$

3.5. Pre-procesamiento de las imágenes de cada banda espectral

, donde $\min(dif)$ es el mínimo valor de intensidad de la imagen dif . A la imagen resultante min_dif se la normaliza de la siguiente manera:

$$imagen_final = \frac{min_dif}{\max(dif) - \min(dif)} = \frac{dif - \min(dif)}{\max(dif) - \min(dif)} \quad (3.9)$$

, donde $\max(dif)$ es el máximo valor de intensidad de la imagen dif e $imagen_final$ es la imagen resultante del proceso de normalización.

Se hace notar que el proceso de corrección de la iluminación no uniforme y del *vignetting* resultó fundamental para poder aplicar el algoritmo de detección de los defectos, esto es para distinguir el *foreground* del *background*, como se explicó en la sección 3.4. Para ejemplificar esto y para ilustrar la operación de la expansión del histograma de la ecuación 3.9, en la Figura 3.31 se muestra una región con un defecto de la imagen original y de la final así como los histogramas de intensidad de los píxeles de la diagonal de la misma región asociados.

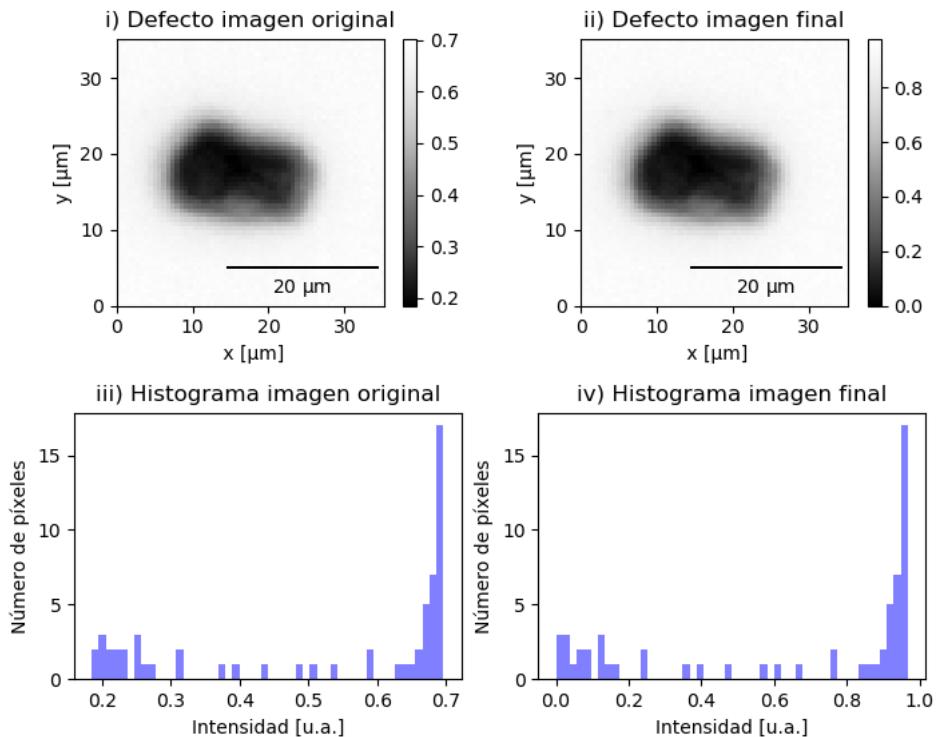


Figura 3.31: i) Imagen original de una región con un defecto. ii) Imagen resultante del proceso de normalización de la misma región que i). iii) Histograma de los píxeles de la diagonal de la imagen i). iv) Histograma de los píxeles de la diagonal de la imagen ii).

De la comparación entre los histogramas iii) y iv) se observa que el rango de intensidades de los píxeles de la región con un defecto de la imagen original se extiende desde el intervalo [0.19,0.70] al intervalo [0.00,0.98] en la imagen final¹¹. De esta manera, se mejora el contraste de la imagen y la distinción entre el *foreground* (defectos) y el *background* se puede realizar ajustando un umbral de intensidad (*threshold*). A continuación se explica el criterio de elección del método del *threshold* aplicado y luego se describe el algoritmo de detección de los defectos y su cuantificación.

3.6 Criterio de elección del *threshold*

Con las imágenes pre-procesadas la detección de los defectos fue realizada utilizando algoritmos de procesamientos de imágenes. En particular se utilizaron algoritmos de *thresholding* que determinan un umbral de intensidad a partir del cual se crea una imagen binaria que distingue el *background* de los defectos [Shapiro, 2002].

Para determinar el umbral de intensidad óptimo para todas y cada una de las imágenes individuales de una banda se utilizó el método *try_all_threshold* de la librería *scikit-image* del lenguaje *python* [Van der Walt et al., 2014]. Se hace notar que si bien se podrían haber utilizado distintos *thresholds* para cada imagen ó para distintos sets de imágenes de una misma banda, se decidió elegir un sólo método de umbral para todas y cada una de las bandas para poder automatizar la aplicación del algoritmo de detección de los defectos y de la posterior asociación de incertezas a los resultados.

El criterio de elección del umbral fue adoptado a partir de la inspección visual. Se observó visualmente el resultado (en adelante *output*) de la aplicación de los distintos *thresholds* para cada imagen de cada banda. A continuación se muestran algunas imágenes representativas en conjunto con el *output* de la aplicación de los distintos *thresholds* para explicar el criterio de elección del umbral aplicado a todas las imágenes de todas las bandas.

1. Se descartaron los *thresholds* a partir de los cuales algunas de las imágenes binarias

¹¹Para la imagen completa, el rango se extiende desde [0.19,0.73] para la imagen original al rango [0.00,1.00] de la imagen final, es decir el rango de intensidades de la imagen original se extiende a todo el rango posible de acuerdo a la ecuación 3.9 de la expansión del histograma.

generadas contenían una gran cantidad de falsos positivos. Esto último resultó ser el caso de los métodos *Li*[Li and Lee, 1993], *Mean*[Glasbey, 1993] y *Otsu*[Otsu, 1979], como se puede observar en la Figura 3.32. Por el motivo contrario, es decir por no contener ningún defecto en algunas de las imágenes binarias generadas, el umbral *Minimum*[Prewitt and Mendelsohn, 1966] fue descartado.

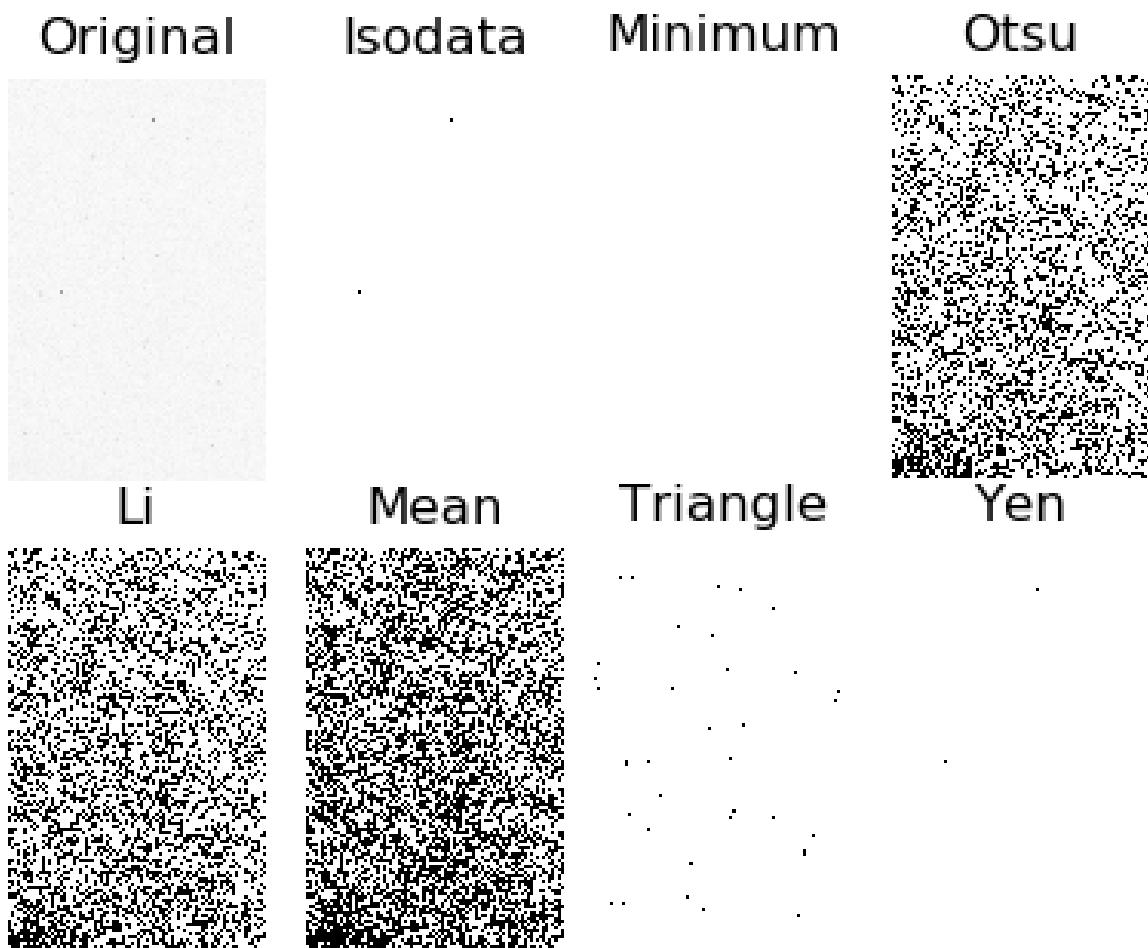


Figura 3.32: Figura del *output* del método *try_all_threshold* de la librería *scikit-image* del lenguaje *python* (Ver ☑).

2. Si bien en la gran mayoría de las imágenes los métodos *Isodata*[Ridler, 1978], *Triangle*[Zack et al., 1977] y *Yen*[Jui-Cheng Yen et al., 1995] tuvieron una buena relación entre el número de falsos positivos y el número de defectos detectados por inspección visual, el único *threshold* que mantuvo dicha relación con un valor menor a 1 para todas las imágenes de todas las bandas fue el del método *Yen*. Por ejemplo en la Figura 3.33 se

muestra una región de una imagen con 2 defectos detectados por inspección visual y el método *Yen* fue el único capaz de detectarlos de forma singular.

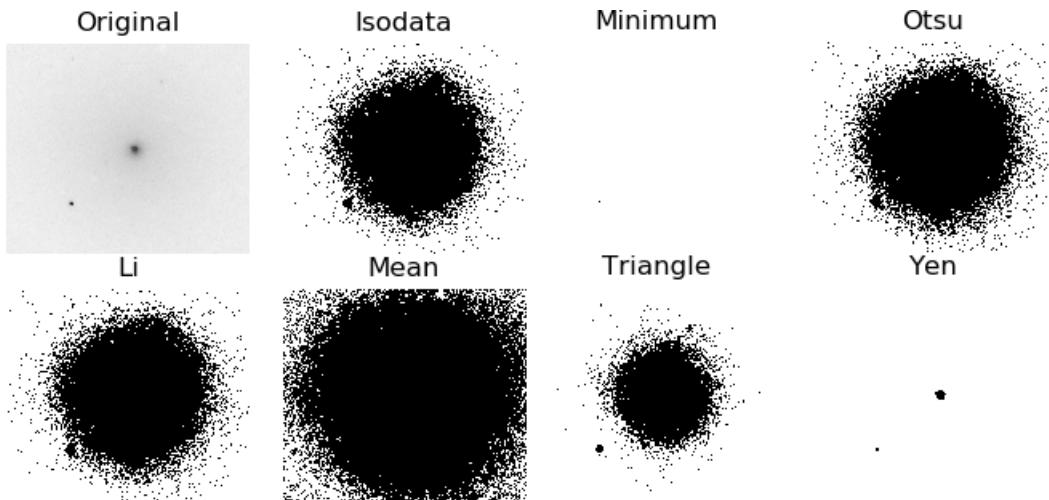


Figura 3.33: Región de una imagen individual en conjunto con el *output* de la Figura del *output* del método *try_all_threshold* de la librería *scikit-image* del lenguaje *python* (Ver ).

Una vez determinado el *threshold* aplicable a todas las imágenes de todas las bandas, se desarrolló el algoritmo de detección y cuantificación de los defectos del filtro que se explica en la siguiente sección.

3.7 Algoritmo de detección y cuantificación de los defectos

En esta sección se explica el algoritmo utilizado para la detección y cuantificación de los defectos del filtro. El diagrama de flujo del algoritmo aplicado se muestra en la Figura 3.34.

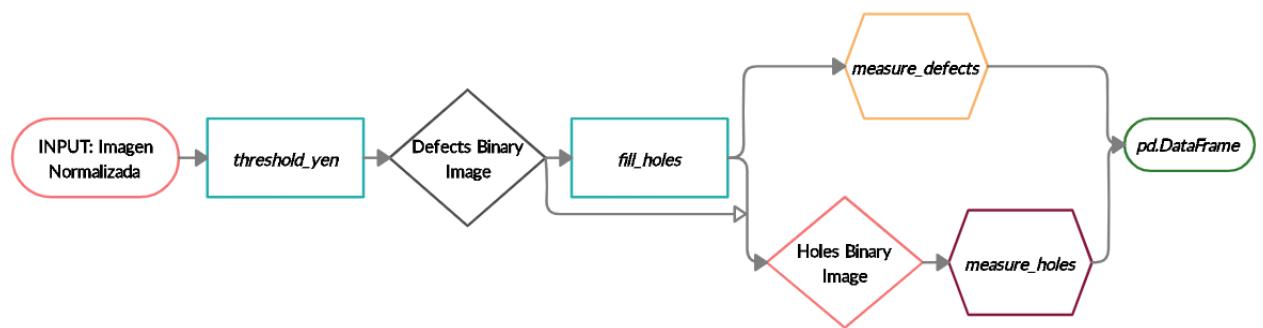


Figura 3.34: Diagrama de flujo del algoritmo de detección y cuantificación de los defectos del filtro.

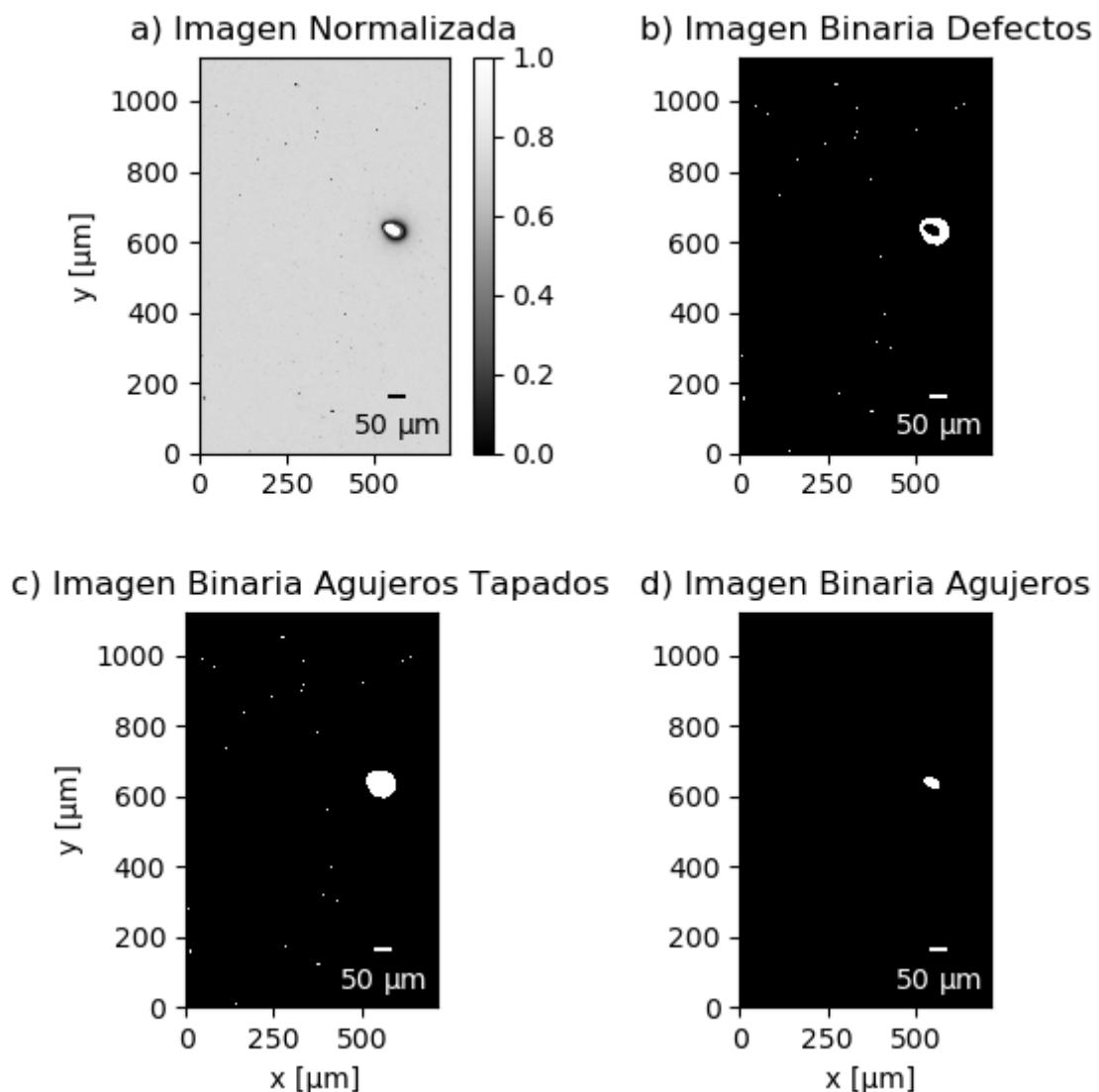


Figura 3.35: a) Imagen normalizada de la banda celeste que contiene un agujero. b) Imagen binaria generada a partir del *threshold* de Yen. c) Imagen con los agujeros de la imagen b) tapados con el método *binary_fill_holes* de la clase *ndimage* de la librería *scipy* del lenguaje *python*. d) Imagen binaria con el agujero detectado.

Utilizando el diagrama de flujo de la Figura 3.34 y la Figura 3.35 como guías didácticas, a continuación se explican los pasos del algoritmo aplicado para cada imagen individual de cada banda:

1. INPUT: Imagen Normalizada. Se lee la imagen normalizada. En la imagen a) de la Figura 3.35 se muestra una imagen normalizada de la banda azul que contiene el agujero

3. Cuantificación de los defectos

más grande encontrado en el filtro (caracterizado espectralmente en el Capítulo 5) y otros defectos de transmisión (manchas negras) más pequeños. En consecuencia, la imagen es representativa de lo que sería el caso más general de la aplicación del algoritmo para detectar tanto defectos de transmisión como agujeros.

2. *threshold_yen*. Se calcula el *threshold* de *Yen* con el método *threshold_yen* de la librería *scikit-image*. En la Figura 3.36 se muestra el histograma de intensidad de píxeles de la imagen, con el eje vertical en escala logarítmica. La línea vertical roja indica el valor calculado del *threshold* de *Yen* que para esta imagen de ejemplo su valor fue de 0.57. Se hace notar que dicho valor de intensidad umbral es global de toda la imagen y para cada imagen se calcula un *threshold* de *Yen* individual.

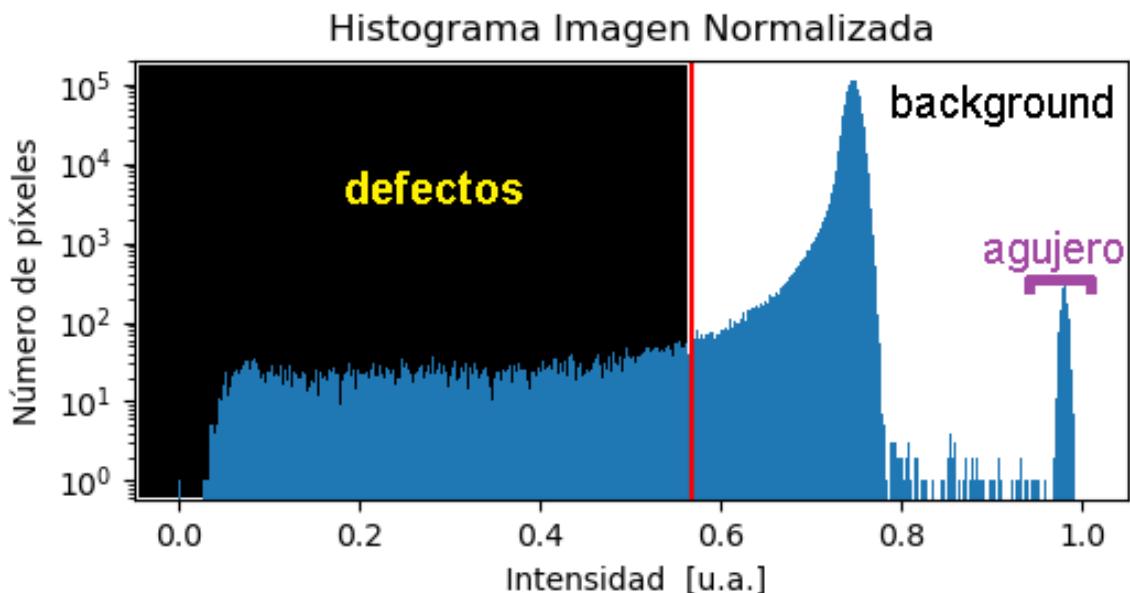


Figura 3.36: Histograma de intensidad de los píxeles de la imagen a) de la Figura 3.35, con el eje vertical en escala logarítmica. La línea roja vertical indica el valor del *threshold* de *Yen* para dicha imagen.

3. *Defects Binary Image*. Se genera una imagen binaria de la imagen normalizada como se muestra en la imagen c) de la Figura 3.35. Para cada píxel de la imagen normalizada se compara su valor de intensidad con el valor del *threshold* y se asigna un 1 (blanco, *background* y agujeros) si el valor de intensidad del píxel es mayor que el *threshold* y un 0 (negro, defectos) si ocurre lo contrario. Esto último se puede ver en el histograma de la Figura 3.36.

4. *fill_holes*. Se tapan los agujeros como se muestra en la imagen d) de la Figura 3.35 con el método *binary_fill_holes* de la clase *ndimage* de la librería *scipy* del lenguaje *python* [Virtanen et al., 2020].

Se hace notar que en el contexto de imágenes binarias un defecto de transmisión es un objeto matricial de ciertas dimensiones en píxeles cuyos elementos de matriz son todos iguales a 1 (color blanco). Y, un agujero es un objeto matricial cuyo borde tiene elementos de matriz iguales a 1 (color blanco) pero los elementos de matriz del interior de dicho borde son iguales a 0 (color negro). Lo que el método *binary_fill_holes* realiza es encontrar objetos que cumplan la condición matricial de un agujero y llenar su interior de píxeles blancos. El tamaño del agujero a tapar puede ser elegido por el usuario a partir de las dimensiones de la matriz de píxeles blancos utilizada. Esta matriz es especificada en el argumento *structure* del método *binary_fill_holes* y es un parámetro fundamental que debe ser especificado de acuerdo a los requerimientos de calidad óptica del usuario ya que su tamaño define el tamaño mínimo del agujero a detectar. En la presente tesis dicho parámetro fue dejado sin especificar, el método tomó el valor por *default* por lo que todos los agujeros encontrados fueron tapados.

A continuación se explica la bifurcación en el algoritmo de la detección de defectos en general por un lado sin discriminar su tipo y la detección específica de agujeros por el otro lado.

5. *measure_defects*. La detección de los defectos en general fue realizada sobre las imágenes binarias con los agujeros tapados (Ver imagen c) de la Figura 3.35). En consecuencia, no se distinguieron los agujeros de los defectos de transmisión, sino que todos los defectos fueron considerados defectos de superficie de acuerdo a las especificaciones técnicas de la ISO 10110 (Ver Sección 3.1.2). Por este motivo resultó importante realizar el tapado de los agujeros ya que sino se modificaría el valor del área total de los defectos con estas características, considerando a estos como un solo objeto compuesto por una mancha negra que bordea a un agujero blanco, como por ejemplo de acuerdo al defecto más grande de la Figura 3.35. Este mismo defecto sin tapar tenía un área (dada por el número de píxeles) de $(4108.39 \pm 0.59)\mu m^2$ pero el mismo agujero tapado, es decir el defecto a estimar, tenía un área de $(5174.29 \pm 0.59)\mu m^2$, por lo que se hubiese obtenido un 20.6%

de error.

En la imagen binaria con los agujeros tapados, los defectos ya se encontraban segmentados, es decir que los defectos eran regiones aisladas de píxeles blancos conectados entre sí. El método *measure.label* etiqueta a cada uno de los defectos cuyas propiedades son calculadas con el método *measure.regionprops_table* y luego guardadas en un *DataFrame* de la librería *pandas*[McKinney, 2010]¹². Las propiedades de los defectos calculadas fueron el área y el diámetro equivalente¹³:

- El área fue calculada a partir del número de píxeles totales que conforman al defecto, siendo un píxel la menor unidad homogénea en color que forma parte de una imagen digital. Así por ejemplo el defecto más grande de la imagen c) de la Figura 3.35 estaba formado por 15068 píxeles. De acuerdo a la calibración del microscopio 1 píxel cuadrado equivale a $0.586 \mu m \times 0.586 \mu m$, con lo cual $15068 \text{ píxeles} = 15068 \cdot (0.568\mu m)^2 = 5174.29 \mu m^2$.
- El diámetro equivalente consiste en el diámetro de un círculo con la misma área calculada en el paso anterior. Igualando dicha área con el área de un círculo, $\pi \cdot (\frac{\text{diámetro}}{2})^2$, se obtiene el diámetro equivalente.

6. **Holes Binary Image.** La imagen binaria de los agujeros segmentados (Ver Imagen d) de la Figura 3.35) fue generada a partir de tomar la diferencia entre la imagen binaria de los agujeros tapados y la imagen binaria de los defectos. Dicha forma de segmentar los agujeros como objetos matriciales cuyo borde son unos y el interior son ceros resultó ser la forma más eficiente para no obtener una gran cantidad de falsos positivos (detección de agujeros que en realidad no lo son). Con este método el máximo número de agujeros encontrado en una banda fue de 12 con lo cual la verificación de los falsos positivos del método se realiza rápidamente observando visualmente las imágenes en las que fueron detectados.

Párrafo aparte merece la explicación de un método alternativo que se ensayó para intentar segmentar los agujeros pero que arrojaba una gran cantidad de falsos positivos

¹²Un *DataFrame* de *pandas* es una estructura de datos que permite una rápida visualización de los datos como en una planilla de excel y que tiene una gran familia de métodos a su disposición para realizar un análisis cuantitativa de los datos.

¹³Muchas otras propiedades podrían haber sido también calculadas automáticamente pero no fueron necesarias en el presente trabajo (Ver *measure.regionprops*).

(Ver ). En el histograma de la Figura 3.36 se observa claramente la región de valores de intensidad cercanos a la saturación (en escala monocromática de la imagen normalizada) que pertenecen al agujero de la imagen a) de la Figura 3.35. Aplicando un *threshold* de intensidad de 0.97 se detecta singularmente el agujero de dicha imagen. Ahora bien, este mismo umbral (ó cualquier variación del mismo) aplicado al conjunto de imágenes de la misma banda arroja miles de falsos positivos de tamaños tan grandes como los propios agujeros reales detectados visualmente. Esto ocurre pues el fondo de la imagen normalizada contiene regiones conectadas de píxeles con mayor ó igual valor de intensidad que tiene el centro de un agujero. Además, otro motivo por el que se descartó este método es debido a la definición matricial del agujero data anteriormente que supone que cada agujero presente en las imágenes normalizadas tiene un centro blanco con valores de intensidad cercanos a 1 pero que tiene un borde perimetral oscuro.

Ahora bien, se detectaron los agujeros para poder ubicarlos espacialmente en el filtro de forma tal de poder caracterizar a los agujeros espectralmente como se explica en el Capítulo 5. Esto es, para cada agujero detectado se conocen sus coordenadas en la imagen que fue hallado y como al mismo tiempo se conoce la posición de cada imagen individual en el barrido completo de una banda, se determinan las coordenadas del agujero en el filtro. Este *feature* del algoritmo permite rápidamente descartar un filtro si no cumple con las especificaciones técnicas requeridas por la aplicación del usuario final y resulta independiente del inspector de turno del filtro como en el caso de la aplicación de la métrica de *scratc & dig* (Ver Sección 3.1.1).

7. ***measure_holes*** A partir de la imagen segmentada de los agujeros se repite el proceso implementado en el paso del algoritmo ***measure_defects***: se etiquetan a los agujeros y se mide su área y su diámetro equivalente. Dichos resultados son concatenados al *DataFrame* de pandas.
8. ***pd.DataFrame***. Los resultados de los defectos en general y de los agujeros contenidos en un *DataFrame* son exportados en un archivo *pickle*¹⁴ que fue manipulado utilizando el entorno interactivo de *IPython Notebook*. Por último, con el método *morphology.remove_small_objects* se puede elegir el tamaño de los defectos a incluir en el análisis

¹⁴Con 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.

definitivo dependiendo de la aplicación del usuario final y del sector de la industria óptica.

A continuación se muestran los resultados del algoritmo de detección de los defectos de superficie en general y su discusión considerando las especificaciones técnicas de *scratch & dig* y de la ISO 10110 (Secciones 3.1.1 y 3.1.2 respectivamente). Luego se muestran los resultados de la detección de los agujeros y posteriormente se hace un análisis de los errores asociados a las dimensiones de los defectos detectados a partir del algoritmo.

3.8 Resultados del algoritmo de detección de los defectos de superficie

En esta sección se describen los resultados del algoritmo de detección de los defectos de superficie en general sin discriminar su tipo. Se muestran los resultados cuantitativos de los defectos de cada banda y el análisis de las dos especificaciones técnicas consideradas.

3.8.1 Aplicación de las especificaciones técnicas

Banda	# de defectos	$d_{máx}$	$\sum d$	% área defectos
Azul	8723	81.17 μm	32.18 mm	0.15%
Verde	3029	35.21 μm	12.56 mm	0.08%
Pancromática	2606	51.43	12.06 mm	0.09%
Rojo	1745	43.52 μm	8.57 mm	0.06%
NIR	2013	25.39 μm	9.31 mm	0.05%

Tabla 3.1: Resultados principales del algoritmo de detección de los defectos de superficie.

El fabricante del filtro indicó en la hoja de datos que los números de *scratch & dig* para cada banda del filtro son: S/D 20-10. La especificación del *scratch number* lamentablemente no pudo ser verificada en la presente tesis por no contar con muestras calibrada de *scratches* ni tampoco conocer la muestra específica ni las condiciones experimentales utilizadas por el fabricante en el control de calidad.

De acuerdo al *dig number* igual a 20, cada banda el filtro no debería tener más de 2 defectos

3.8. Resultados del algoritmo de detección de los defectos de superficie

de diámetro máximo de $100 \mu m$ (de acuerdo a 3.2) y la suma de los diámetros de todos los defectos no debería ser superior a 0.4 mm (de acuerdo a 3.3). La primera condición se cumple como se desprende de los diámetros máximos ($d_{máx}$) de los defectos encontrados en cada banda: ninguno supera los $100\mu m$ de diámetro (Ver Tabla 3.1). Ahora bien, la segunda condición no se cumple pues cada uno de los valores de la columna de la Tabla 3.1, $|\sum d|$, superan los $0.4mm$ y por ende la suma también. Se hace notar que el control de calidad de la métrica de *scratch & dig* suele ser realizada por un inspector entrenado que utiliza muestras calibradas (Ver Figura 3.3) para la determinación y conteo de los *digs* por lo que las condiciones experimentales no son las mismas (Ver ).

De acuerdo a las especificaciones técnicas de la ISO 10110 (Ver Sección 3.1.2) el filtro podría tener un máximo de 2 defectos de $63 \mu m$ de diámetro y el área máxima cubierta por los defectos puede ser de $7938 \mu m^2$.

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados principales del algoritmo de detección de los defectos de superficie. La columna **|# de defectos|** indica el número de defectos encontrados por el algoritmo, la columna **| $d_{máx}$ |** indica el diámetro máximo de los defectos detectados. La columna **| $\sum d$ |** representa la suma de todos los diámetros de los defectos y por último la columna **|% área defectos|** indica el porcentaje de área cubierta por los defectos, considerando el 100% del área de acuerdo a las dimensiones del barrido realizado de cada banda. Las incertezas de los diámetros son de $0.59\mu m$ en todos los casos.

PROVEEDOR NOS DIJO QUE LA CALIDAD OPTICA LA CHEQUEÓ CON UNA TARJETA CALIBRADA, NO CON UN MICROSCOPIO.. ENTONCES HAY QUE USAR LO MISMO PARA PODER COMPARAR..

iso10110 dice que no puede haber defectos con un GRADE NUMBER mayor al especificado.. y si está entre dos valores de 2 grade numbers?

La cuantificación permitió por un lado verificar las especificaciones ópticas indicadas por el fabricante, bajo ciertas condiciones y estable El método de inspección que se describe a continuación no pretende ser una alternativa a la inspección visual de la calidad de los componentes sino más bien

3. Cuantificación de los defectos

a futuro.. hacer dark field de esto o DIC..

Banda	# de agujeros	$d_{máx}$ agujeros
Azul	12	$36.82 \mu m$
Verde	3	$11.24 \mu m$
Pancromática	0	-
Rojo	3	$9.16 \mu m$
NIR	2	$6.84 \mu m$

En el Capítulo 3 se realizó una descripción cuantitativa de los defectos: se determinó su tamaño, área, la cantidad de defectos presentes en cada banda. Este tipo de análisis de los defectos sigue la línea de las especificaciones técnicas de *scratch & dig* y la ISO 10110 en cuanto a que no realizan un análisis cualitativo de los defectos. En el presente trabajo se montó un microespectrómetro para caracterizar espectralmente los defectos. Esto es,

Eventualmente la sección características del filtro va en la intro?

para poner el error del método en decir un defecto es de 15 mics \pm poner el error del método triangle que le emboca a todos los defectos pero SOBREESTIMA el tamaño, los hace mucho más grandes..

small crater on the polished optical surface .. decir algo que los agujeros son lo que dice antes

en la sección características del filtro, en el ítemize de las bandas..ver de explicar para qué sirve cada banda, usar por ej: link

..... 3.8. Resultados del algoritmo de detección de los defectos de superficie 

si hace falta explicar un poco en que consisten los filtros ópticos de interferencia..

explicar que tipo de lámpara es la del Zeiss

Cómo asociar errores a las dimensiones medidas tanto con el Fiji como con el algoritmo. Al error de las imágenes del Zeiss se le pone la calibración, por ej $\pm 0.586 \mu\text{m}$, aprox 0.59 micrones de error

hace falta explicar las cuentas de la normalización de las imágenes.. o que lean la cita de Nordenfelt

estimación de errores, ROI estimación de falsos positivos falsos negativos tasa de error del sistema, por inspección visual nomás

ver imágenes y cuantificar cuántos defectos de los más chicos no agarra, se hace a ojo si o sí, revisar banda completa tomando nota de defectos reales vs defectos encontrados y cuantificarlo de alguna manera

diagrama de flujo para el algoritmo de detección

3. Cuantificación de los defectos

explicar que tipo de lampara es, escuchar audio hernan, poner el codigo de github del espectro con colores facha

buscar warning box FACHA

Falta: poner siempre la barrita de la escala en las imágenes

Capítulo 4

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

Capítulo 5

Microespectrómetro

En este capítulo se describe el montaje y la caracterización de un microespectrómetro utilizado para caracterizar espectralmente los defectos del filtro.

5.1 Diseño óptico del microespectrómetro

5.2 Montaje y alineación preliminar del microespectrómetro

5.3 Foco y resolución espacial del microespectrómetro

Para poner en foco el microespectrómetro sobre la cara externa del filtro más cerca al objetivo, se buscó el mínimo de la resolución espacial.

La resolución espacial se obtiene a partir del ajuste de las mediciones de una transición banda-cromo.

Para no alargar el tiempo de duración de las mediciones se mapeó el espectrómetro con la cámara. De lo contrario el único feedback que se tiene para saber si se está en una banda o en el cromo es la medición del espectro.

En consecuencia se conectó la fibra óptica montada sobre el cage destinado a medir con el

espectrómetro, a la fuente de luz y por reflexión se observó en la adquisición en vivo de la cámara en qué posición de la imagen se observaba el haz de luz reflejado. Se centró dicho haz al centro de la cámara y de esa forma se determinó que el centro de la cámara está asociado con la medición efectiva del microespectrómetro. Se hace notar que la cámara no se encuentra en foco todavía, solo fue puesta aproximadamente a la misma distancia focal que la lente de tubo.

El setup para realizar este mapeo es el siguiente:

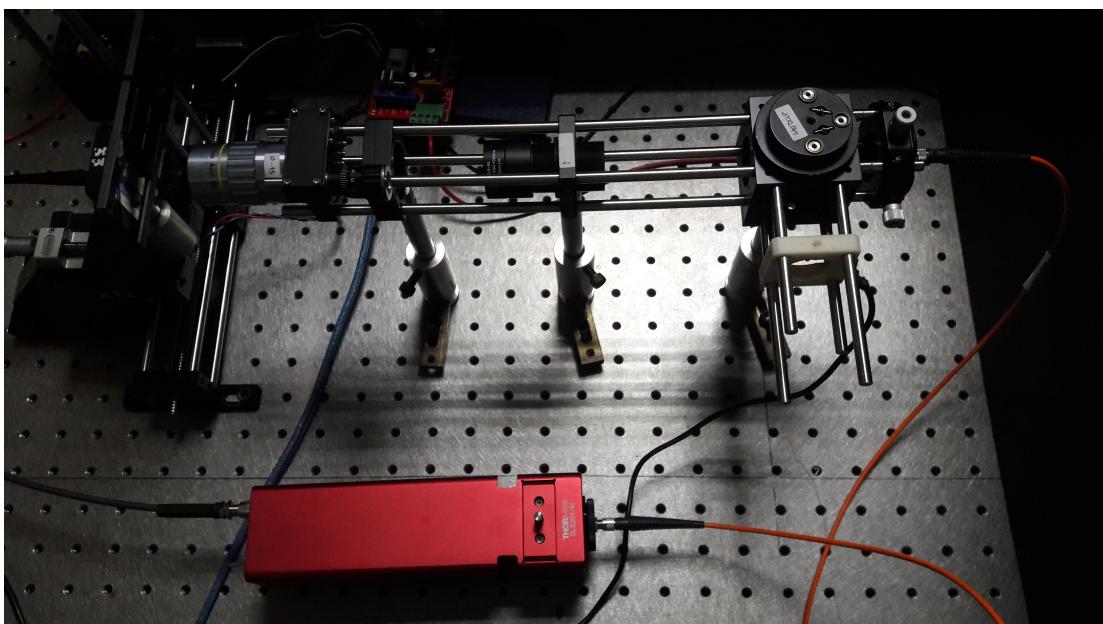


Figura 5.1: Setup para mapear el espectrómetro con la cámara.

Con los tornillos de la tapa de arriba del beamsplitter se puede ajustar en altura el beamsplitter para poder observar en el centro de la cámara la medición del espectrómetro.



Figura 5.2: Tapa de arriba del beamsplitter.

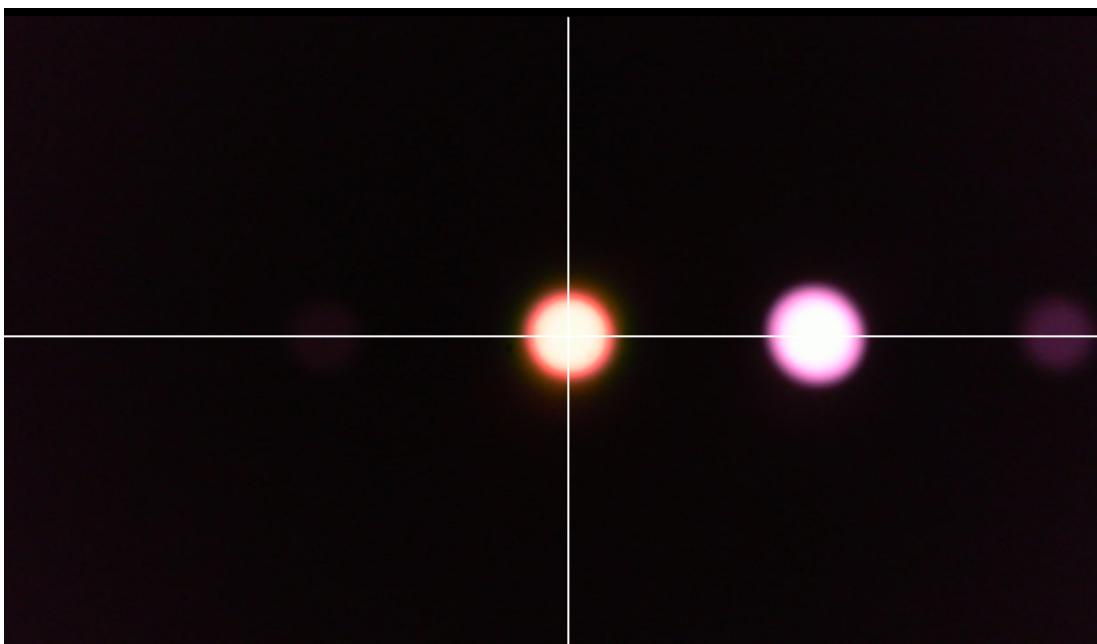


Figura 5.3: Visualización en la cámara de la reflexión del filtro de la iluminación.

No se tocó ni la cámara ni ninguna parte del setup a partir de ese momento para no perder este mapeo, a pesar de que la cámara no se encuentre perfectamente en foco (no hace falta probablemente poner una imagen de la cámara mostrando que no está en foco..), es decir que la imagen no se vea del todo nítida. Luego se puso en foco el microespectrómetro.

5. Microespectrómetro

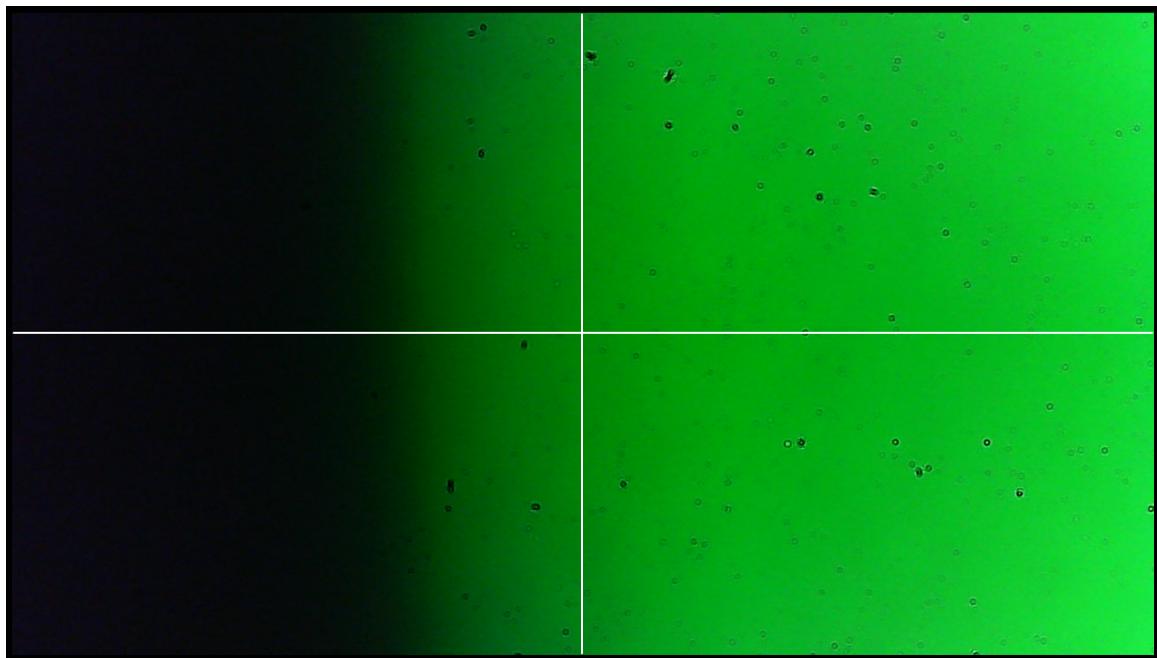


Figura 5.4: Visualización en la cámara de la reflexión del filtro de la iluminación.

durante el experimento se tiene el feedback de cutelog:

cuteLog					
File		Tab		Server	
Records		Help			
Logger	X	Logger 1	X	Logger 2	X
Log namespaces					
Root logger					
2020-03-13 14:11:58.605885		Root logger	INFO	CCS200/M Spectrometer CONNECTED	
2020-03-13 14:11:58.736046		Root logger	INFO	XZStage - Serial: COM5	
2020-03-13 14:12:01.736113		Root logger	INFO	XZStage in position (0,0,0)µm	
2020-03-13 14:12:01.742215		Root logger	INFO	Target position: (0,0)µm	
2020-03-13 14:12:02.207776		Root logger	INFO	Position achieved correctly.	
2020-03-13 14:12:02.766726		Root logger	INFO	Target position: (1,0)µm	
2020-03-13 14:12:03.207101		Root logger	INFO	Position achieved correctly.	
2020-03-13 14:12:03.809366		Root logger	INFO	Target position: (2,0)µm	
2020-03-13 14:12:04.034000		Root logger	DEBUG	Still moving	
2020-03-13 14:12:04.383814		Root logger	INFO	Position achieved correctly.	
2020-03-13 14:12:04.964578		Root logger	INFO	Target position: (3,0)µm	
2020-03-13 14:12:05.449858		Root logger	INFO	Position achieved correctly.	
2020-03-13 14:12:06.001255		Root logger	INFO	Target position: (4,0)µm	
2020-03-13 14:12:06.440235		Root logger	INFO	Position achieved correctly	
Levels					
Show	Name				
DEBUG					
INFO					
WARNING					
ERROR					
CRITICAL					
Name		Value			

Figura 5.5: Visualización en la cámara de la reflexión del filtro de la iluminación.

5.3. Foco y resolución espacial del microespectrómetro

Logger						
Log namespaces						
Root logger						
Time	Name	Level	Message			
2020-03-13 14:15:28.457699	Root logger	INFO	Position achieved correctly.			
2020-03-13 14:15:29.009384	Root logger	INFO	FINISHED SCANNING.			
2020-03-13 14:15:29.062736	Root logger	INFO	MEASUREMENT Thread done, it took: 0.05935945451259613 hs.			
2020-03-13 14:15:29.072731	Root logger	INFO	Target position: (0,0)µm			
2020-03-13 14:15:29.200701	Root logger	DEBUG	Still moving			
2020-03-13 14:15:29.404321	Root logger	DEBUG	Still moving			
2020-03-13 14:15:29.806079	Root logger	INFO	Position achieved correctly.			
2020-03-13 14:15:29.830155	Root logger	INFO	XZStage is home.			
2020-03-13 14:15:29.850173	Root logger	INFO	CCS200/M Spectrometer DISCONNECTED			
2020-03-13 14:15:29.889691	Root logger	INFO	XZStage DISCONNECTED			
2020-03-13 14:15:30.762689	Root logger	INFO	STORAGE Thread done, it took: 0.05983166376749675 hs = 3.5898998260498045 minutes			
2020-03-13 14:15:30.791293	Root logger	INFO	TOTAL TIME: 0.05983166376749675 hs = 3.5898998260498045 minutes			
Connection 3 closed						
Levels						
Show	Name					
DEBUG						
INFO						
WARNING						
ERROR						
CRITICAL						

Figura 5.6: Visualización en la cámara de la reflexión del filtro de la iluminación.

Las mediciones son ajustadas en matlab con una función error:

$$(a/2) * erfc(sqrt(2) * (x - b)/c) \quad (5.1)$$

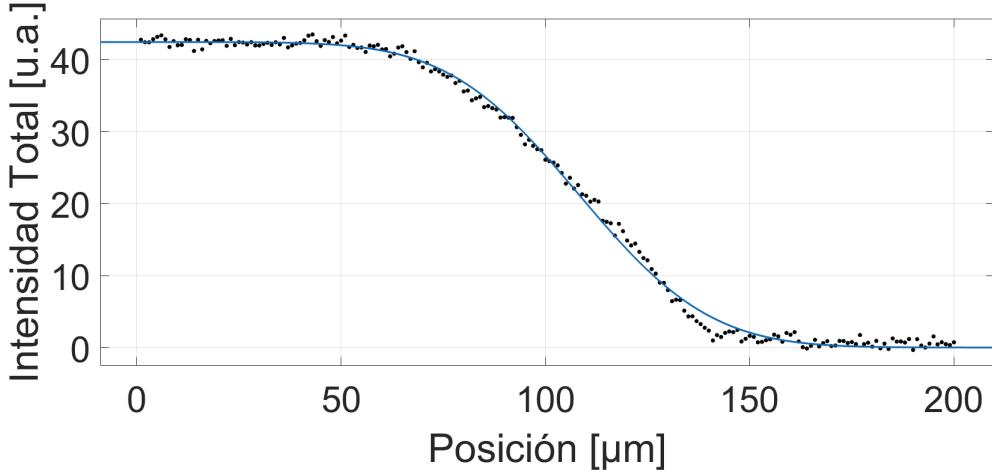


Figura 5.7: Visualización en la cámara de la reflexión del filtro de la iluminación.

Resultados del ajuste:

General model:

$$f(x) = (a/2) * erfc(sqrt(2) * (x - b)/c)$$

Coefficients (with 95% confidence bounds):

$$a = 42.43(42.2, 42.66)$$

$$b = 108.2(107.8, 108.7)$$

$$c = 50.46(49.25, 51.68)$$

Goodness of fit:

SSE: 151.1

R-square: 0.9976

Adjusted R-square: 0.9976

RMSE: 0.8758

Luego moviendo la perilla del SM1Z para cambiar la distancia entre el objetivo y el filtro se repite la medición.

Comentar bien la siguiente foto, poner en la imagen que distancia se está variando, etc

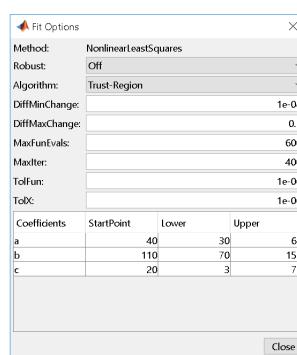


Figura 5.8: Visualización en la cámara de la reflexión del filtro de la iluminación.

Para hacer el ajuste se refinan los parámetros del modelo:

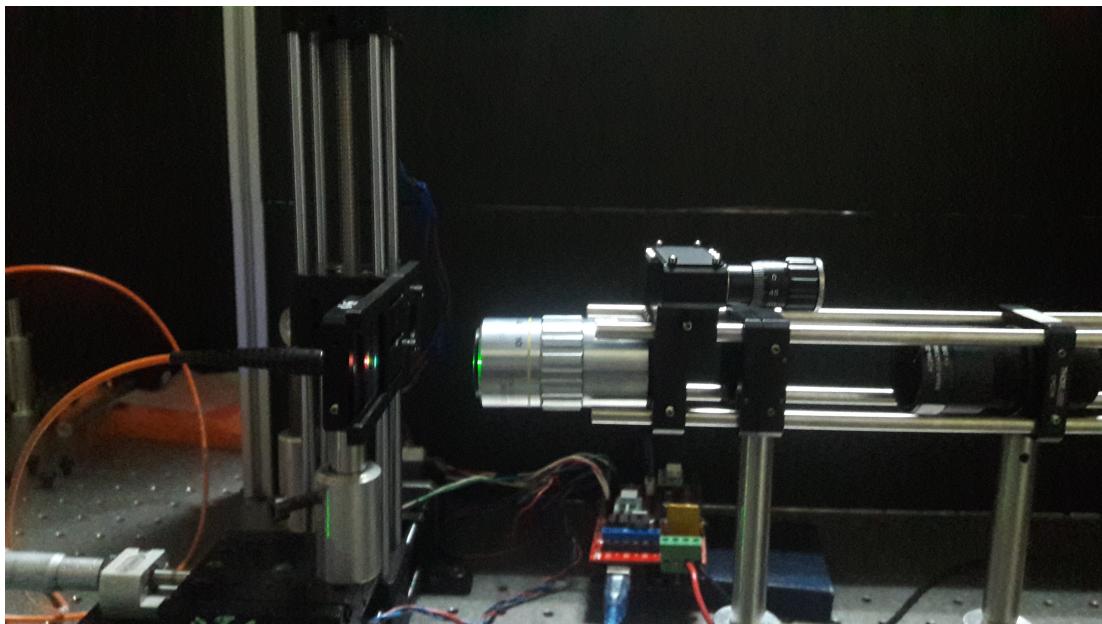


Figura 5.9: Visualización en la cámara de la reflexión del filtro de la iluminación.

La idea es poner en foco el espectrómetro en alguna región del filtro, enfocar luego la cámara y después al mover el filtro a alguna otra región, tan solo hay que poner en foco el 'sistema' mirando la cámara. Al mismo tiempo si se quiere se puede volver a repetir el procedimiento de buscar el mínimo.

Gráfico de poner en foco el microespectrómetro: (19 de marzo)

mediciones guardadas en: data mediciones, simultaneidad, foco.

vamos recorriendo horario en pasos de 50 micrones en el SM1Z. mediciones que consisten en un barrido de 80 micrones de largo, con pasos de 1 micron.. esto en la stage

RESULTADOS:

Z RESOLUCIÓN

0 12.46 dudoso?

-50 13.5

-100 13.12

5. Microespectrómetro

-150 12.87

-200 11.29

■ 5.4 Integración de una cámara web

■ 5.4.1 Mapeando el espectrómetro con la cámara

Capítulo 6

Conclusiones

Capítulo 7

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.
- [Aikens, 2010] Aikens, D. M. (2010). The truth about scratch and dig. In *International Optical Design Conference and Optical Fabrication and Testing*, page OTuA2. Optical Society of America.
- [Erdodan and Prabhat, 2012] Erdodan, T. and Prabhat, P. (2012). *Semrock Technical Note Series: Measurement of Optical Filter Spectra*. Semrock.
- [Etzold et al., 2016] Etzold, F., Kiehaber, D., Warken, A., Würtz, P., Hon, J., and Asfour, J.-M. (2016). A novel approach towards standardizing surface quality inspection. page 1000908.
- [Glasbey, 1993] Glasbey, C. (1993). An analysis of histogram-based thresholding algorithms. *CVGIP: Graphical Models and Image Processing*, 55(6):532 – 537.
- [Gomez et al., 1998] Gomez, S., Hale, K., Burrows, J., and Griffiths, B. (1998). Measurements of surface defects on optical components. *Measurement Science and Technology*, 9(4):607–616.
- [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.
- [ISO, 2018] ISO (2018). *ISO 10110 - Preparation of drawings for optical elements and systems*.
- [Jain, 1989] Jain, A. K. (1989). *Fundamentals of Digital Image Processing*. Prentice-Hall, Inc., USA.
- [Jui-Cheng Yen et al., 1995] Jui-Cheng Yen, Fu-Juay Chang, and Shyang Chang (1995). A new criterion for automatic multilevel thresholding. *IEEE Transactions on Image Processing*, 4(3):370–378.

- [Li and Lee, 1993] Li, C. and Lee, C. (1993). Minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition*, 26(4):617 – 625.
- [Lowe, 1999] Lowe, D. G. (1999). Object recognition from local scale-invariant features. In *Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision*, volume 2, pages 1150–1157 vol.2.
- [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.
- [McKinney, 2010] McKinney, W. (2010). Data structures for statistical computing in python. In van der Walt, S. and Millman, J., editors, *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*, pages 51 – 56.
- [Military, 1997] Military, U. (1997). *MIL-PRF-13830B. PERFORMANCE SPECIFICATION: OPTICAL COMPONENTS FOR FIRE CONTROL INSTRUMENTS; GENERAL SPECIFICATION GOVERNING THE MANUFACTURE, ASSEMBLY, AND INSPECTION OF*. U.S. Department of Defense.
- [Nordenfelt et al., 2018] Nordenfelt, P., Cooper, J. M., and Hochstetter, A. (2018). Matrix-masking to balance nonuniform illumination in microscopy. *Opt. Express*, 26(13):17279–17288.
- [Otsu, 1979] Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1):62–66.
- [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.
- [Prewitt and Mendelsohn, 1966] Prewitt, J. M. S. and Mendelsohn, M. L. (1966). The analysis of cell images*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 128(3):1035–1053.
- [Ridler, 1978] Ridler, TW & Calvard, S. (1978). Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 8(8):630–632.
- [Schöch et al., 2018] Schöch, A., Perez, P., Linz-Dittrich, S., Bach, C., and Ziolek, C. (2018). Automating the surface inspection on small customer-specific optical elements. In Schelkens, P., Ebrahimi, T., and Cristóbal, G., editors, *Optics, Photonics, and Digital Technologies for Imaging Applications V*, volume 10679, pages 281 – 291. International Society for Optics and Photonics, SPIE.
- [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.
- [Shapiro, 2002] Shapiro, Linda G. & Stockman, G. C. (2002). *Computer Vision*. Prentice-Hall, Inc., USA.

- [Turchette and Turner, 2012] Turchette, Q. and Turner, T. (2012). Automated inspection of optics using iso specifications. pages 15–16. OPN.
- [Van der Walt et al., 2014] Van der Walt, S., Schönberger, J. L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J. D., Yager, N., Gouillart, E., and Yu, T. (2014). scikit-image: image processing in python. *PeerJ*, 2:e453.
- [Virtanen et al., 2020] Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Jarrod Millman, K., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., Carey, C., Polat, İ., Feng, Y., Moore, E. W., VanderPlas, J., Laxalde, D., Perktold, J., Cimrman, R., Henriksen, I., Quintero, E. A., Harris, C. R., Archibald, A. M., Ribeiro, A. H., Pedregosa, F., van Mulbregt, P., and Contributors, S. . . (2020). SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python. *Nature Methods*, 17:261–272.
- [Zack et al., 1977] Zack, G. W., Rogers, W. E., and Latt, S. A. (1977). Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 25(7):741–753. PMID: 70454.
- [Zeiss, 2014] Zeiss, C. (2014). *ZEISS Axiocam 702 mono. User Guide*.
- [Zeiss, 2016] Zeiss, C. (2016). *Quick Guide. ZEN 2012 SP2. Importing and exporting images*.