

VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Física



Tesis doctoral

Captura y procesado de imágenes de alta resolución mediante sistemas de microscopía integral

Anabel Llavador Ancheta

Directores: Dr. Manuel Martínez Corral
Dr. Genaro Saavedra Tortosa

Mayo 2017

D. Genaro SAAVEDRA TORTOSA y D. Manuel MARTÍNEZ CORRAL, Catedráticos de Universidad del Departamento de Óptica de la Universitat de València,

CERTIFICAN que la presente memoria, *Captura y procesado de imágenes de alta resolución mediante sistemas de microscopía integral*, resume el trabajo de investigación realizado, bajo su dirección, por D^a Anabel LLAVADOR ANCHETA y constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor en Física.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia, a treinta de mayo de dos mil diecisiete.

Dr. Genaro Saavedra Tortosa

Dr. Manuel Martínez Corral

A Juan

A Juan y a Martín

*Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano.*

Isaac Newton

Agradecimientos

Me gustaría dedicar unas líneas para mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una u otra forma han hecho posible la elaboración de esta tesis doctoral.

A la Universitat de València, por la financiación otorgada durante estos años en el marco del programa “Atracció de Talent”.

A mis directores, Manuel Martínez Corral y Genaro Saavedra Tortosa. Hacia ellos mi agradecimiento es doble. Por un lado, por la confianza depositada en mí desde el primer momento, así como por su dedicación y orientación en el desarrollo de las ideas reflejadas en esta tesis. Pero por otra parte, tengo que agradecerles enormemente toda la comprensión y facilidades que me han proporcionado durante todos estos años, ya que sin todo ello no hubiese podido llegar hasta aquí.

A los demás miembros del grupo *3D Imaging & Display* de la Universidad de Valencia. A Amparo Pons y Juan Carlos Barreiro, por sus siempre interesantes aportaciones en las reuniones de grupo. A todos los becarios que en algún momento u otro han pasado por el grupo y con los que he tenido el placer de compartir esta etapa.

A mi familia. En especial a mis padres; por la educación recibida, sin la cual no sería la persona que soy.

A Juan; por su comprensión, paciencia y apoyo en los momentos menos agradables.

Por último, a mis niños, Juan y Martín; Gracias por todo lo demás.

Resumen

El desarrollo de nuevas tecnologías de adquisición de imágenes 3D ha experimentado un avance significativo en los últimos años. Una de las técnicas capaces de preservar la información espacio-angular de objetos extensos es la conocida como *Imagen Integral*. Desde su invención a principios del siglo XX, los sistemas de captura de imagen integral han sido objeto de numerosos estudios, siendo sus aplicaciones muy diversas. Una de las aplicaciones que más interés ha despertado entre los investigadores es la posibilidad de llevar a cabo una reconstrucción en profundidad del objeto, a partir de la información 3D registrada tras una única captura. En la última década, ha tenido lugar un creciente interés en la adaptación de esta tecnología al campo de la microscopía, obteniéndose resultados prometedores. Sin embargo, los sistemas de microscopía integral presentan una serie de limitaciones, algunas de las cuales son inherentes a la tecnología de imagen integral.

En esta Tesis se han establecido los principios teóricos de los sistemas de imagen integral y, en particular del microscopio de imagen integral, prestando especial atención a sus limitaciones más relevantes y proponiendo diferentes soluciones para cada una de ellas. Así, se han presentado diversos métodos para incrementar tanto la profundidad de campo del sistema, como la resolución lateral de las reconstrucciones, ya que esta última resulta ser muy pobre en comparación con las imágenes proporcionadas por un microscopio convencional. Por otra parte, también se ha desarrollado un nuevo algoritmo de reconstrucción en profundidad a partir de un proceso de desconvolución.

Índice

Agradecimientos.....	ix
Resumen.....	xi
Listado de abreviaturas.....	xvii
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Fundamentos de los Sistemas de Imagen Integral	7
2.1. La función plenóptica	7
2.1.1. Parametrización de la función plenóptica y representación a través del diagrama espacio-angular	8
2.1.2. Transformaciones de la función plenóptica	9
2.2. El problema de la cámara fotográfica convencional	12
2.3. Captura de la información angular de escenas tridimensionales.....	14
2.3.1. Sistemas de Imagen Integral de campo cercano	15
2.3.1.1. Configuración del sistema	15
2.3.1.2. Representación de la función plenóptica capturada por un sistema de imagen integral de campo cercano.....	18
2.3.1.3. Resolución espacial y angular en un sistema de imagen integral de campo cercano	19
2.3.1.4. Profundidad de campo en un sistema de imagen integral de campo cercano	20
2.3.2. Sistemas de Imagen Integral de campo lejano.....	22
2.3.2.1. Configuración del sistema	22
2.3.2.2. Delimitación del campo visual de las microlentes en un sistema de imagen integral de campo lejano	26
2.3.2.3. Resolución espacial y angular en un sistema de imagen integral de campo lejano	27

2.3.2.4. Representación de la función plenóptica en un sistema de imagen integral de campo lejano y transformación en el espacio plenóptico.....	29
2.4. Recuperación de la información 3D mediante diferentes algoritmos de reconstrucción	31
2.4.1. Reconstrucción de la escena en profundidad	31
2.4.2. Generación de vistas de la escena 3D	35
Capítulo 3. El microscopio de Imagen Integral	39
3.1. Antecedentes	39
3.2. El microscopio convencional	40
3.2.1. Resolución lateral proporcionada por un microscopio convencional	43
3.3. Configuración de un microscopio de Imagen Integral	47
3.3.1. Distribución de radiancia capturada por un microscopio de Imagen Integral	49
3.4. Relación entre la apertura numérica del objetivo y el tamaño de las microlentes en un microscopio de Imagen Integral.....	50
3.5. Resolución lateral en un microscopio de Imagen Integral	51
3.6. Comprobación experimental de la resolución lateral obtenida con un microscopio de Imagen Integral.....	53
Capítulo 4. Aumento de la resolución espacial de un microscopio de Imagen Integral mediante un proceso de doble captura.....	57
4.1. Aumento de los puntos de muestreo en un microscopio de Imagen Integral	58
4.2. Multiplexado temporal como método propuesto para incrementar los puntos de muestreo en un microscopio integral	61

4.3. Resultados experimentales.....	64
Capítulo 5. Aumento de la profundidad de campo en un microscopio de Imagen Integral.....	71
5.1. Profundidad de campo en un microscopio de Imagen Integral.....	71
5.2. Aumento de la profundidad de campo mediante la inserción de una lente líquida	73
5.3. Resultados experimentales.....	77
Capítulo 6. El Microscopio Integral en el dominio de Fourier	87
6.1. Configuración del microscopio de Imagen Integral en el dominio de Fourier.....	88
6.1.1. Implementación del microscopio integral de Fourier	90
6.1.2. Relación entre el campo visual del objetivo de microscopio y la apertura numérica de las microlentes en un microscopio integral de Fourier	92
6.1.3. Resolución lateral y profundidad de campo en el microscopio integral de Fourier	93
6.2. Resultados experimentales.....	95
6.2.1. Captura y reconstrucción de una muestra 3D con un IMic.....	96
6.2.2. Captura y reconstrucción de una muestra 3D con un FIMic	100
Capítulo 7. Reconstrucción de la escena 3D a través de la respuesta impulsional de un sistema de imagen integral.....	107
7.1. Reconstrucción en sistemas de imagen integral de campo cercano	108
7.1.1. Respuesta impulsional no difractiva y proceso de captura en el sistema de imagen integral	108
7.1.2. Algoritmo de reenfoque de la escena 3D a través de la desconvolución 2D de la imagen integral.....	113
7.1.3. Resultados experimentales.....	115
7.1.3.1. Reenfoque de la escena 3D a partir de la PSF no difractiva ..	115

7.1.3.2. Resolución de las reconstrucciones obtenidas a través del algoritmo de desconvolución	119
7.1.3.3. Reconstrucciones alternativas a partir de la desconvolución 2D con una PSF sintética	121
7.1.3.3.1. Reconstrucción simultánea de diferentes planos de la escena.....	121
7.1.3.3.2. Aumento de la profundidad de campo de las reconstrucciones	123
7.2. Reconstrucción en un sistema de imagen integral de campo lejano.....	124
Capítulo 8. Conclusiones.....	127
Anexo 1.....	131
Anexo 2.....	135
Bibliografía	137

Listado de abreviaturas

DA	Diafragma de apertura
DHM	Microscopía holográfica digital (<i>Digital holographic microscopy</i>)
EI	Imagen elemental (<i>Elemental image</i>)
ETL	Lente sintonizable eléctricamente (<i>Electrically tunable lens</i>)
FIMic	Microscopio integral de Fourier (<i>Fourier integral microscope</i>)
IMic	Microscopio de Imagen Integral (<i>Integral microscope</i>)
LC	Lente de campo
LL	Lente líquida
LSI	Lineal e invariante a desplazamientos (<i>Linear and shift invariant</i>)
LT	Lente de tubo
MLA	Matriz de microlentes (<i>Micro lens array</i>)
NA	Apertura numérica (<i>Numerical aperture</i>)
OTF	Función de transferencia óptica (<i>Optical transfer function</i>)
PRO	Plano de referencia objeto
PSF	Respuesta impulsional (<i>Point spread function</i>)
WD	Distancia de trabajo (<i>Working distance</i>)

Capítulo 1

Introducción

En los últimos años, se ha producido un creciente interés en el desarrollo de técnicas que permitan obtener la información tridimensional (3D) de objetos de volumen. Los sistemas de captura tradicionales no han resultado ser eficaces puesto que no son capaces de preservar la información acerca de la localización en profundidad de los distintos elementos que componen la escena, algo que, por otra parte, representa un gran inconveniente en numerosas áreas de la ciencia y la tecnología.

El interés por la adquisición de imágenes 3D no es, sin embargo, algo que haya surgido recientemente, pues su origen se remonta a principios del siglo XIX. En el año 1838 C. Wheatstone, basándose en los principios de la visión binocular¹, desarrolló el primer estereoscopio para proporcionar imágenes con sensación de profundidad [2]. El dispositivo constaba de dos espejos colocados en ángulo recto, y dos soportes verticales donde se colocaban dos imágenes ligeramente diferentes. Este par de imágenes, o estereograma, era percibido como una única imagen con sensación de profundidad cuando era vista a través del estereoscopio. En 1849 D. Brewster desarrolló un estereoscopio en el cual dos imágenes eran vistas a través de un prisma, el cual se encargaba de fusionar y aumentar la imagen [3],[4]. En 1853, W.

¹ La visión binocular, como su nombre indica, es el tipo de visión en el cual la observación se produce por medio de dos ojos. Las imágenes proyectadas en la retina son ligeramente diferentes, debido a que la perspectiva captada por cada ojo es también distinta. Cuando el cerebro fusiona ambas imágenes, el observador es capaz de obtener una visión 3D del objeto, produciéndose entonces lo que conocemos como visión estereoscópica o *stereopsis* [1].

Rollmann desarrolló el primer anaglifo [5], consistente en dos fotografías, una de color verde y otra de color rojo, tomadas desde posiciones ligeramente desplazadas y superpuestas una encima de la otra. El efecto tridimensional se consigue cuando se visualizan mediante unas gafas especiales. Esta técnica dio lugar incluso a las primeras películas de cine 3D, aunque con relativo poco éxito por parte del público debido a la notable fatiga visual al utilizar las gafas durante prolongados períodos de tiempo, como consecuencia del conflicto convergencia-acomodación [6]. El principal inconveniente de estas y otras técnicas estereoscópicas [7]-[10], es que tan sólo proporcionan una única perspectiva de la escena, independientemente de la posición del observador, de manera que no se produce una verdadera reproducción volumétrica de la misma.

La primera propuesta para la generación de verdaderas imágenes 3D no surgió hasta principios del siglo XX. En el año 1903, F. Ives patentó un estereograma capaz de producir, cuando era visto desde el punto de vista adecuado, una única imagen con sensación de profundidad sin necesidad de utilizar ningún dispositivo óptico [11]. Posiblemente inspirado en estas ideas, en el año 1908, el físico francés² G. Lippmann, ganador del premio Nobel por sus contribuciones en la reproducción del color en fotografía, presentó una novedosa técnica, denominada por él mismo como *Fotografía Integral*, capaz de proporcionar, al menos de manera teórica, imágenes tridimensionales con sensación de profundidad mediante un proceso simétrico de captura/reproducción [12].

Para realizar la captura, la técnica consistía en utilizar una lámina transparente, en cuya cara posterior se colocaba una fina capa de material fotosensible. La capa anterior, por su parte, se encontraba moldeada en forma de pequeños globos de vidrio de forma esférica, funcionando a modo de diminutas lentes convergentes. De esta forma, cada una de estas microlentes es capaz de proyectar la imagen de un cierto objeto sobre la emulsión fotográfica. Para evitar el solapamiento de las pequeñas imágenes registradas

² Gabriel Lippmann nació el 16 de agosto de 1845 en Hollerich, Luxemburgo. No obstante, suele atribuírsele la nacionalidad francesa dado el pronto traslado de su familia a la ciudad de París así como el posterior desarrollo de su carrera en el país.

en la placa, ésta debía ser convenientemente dividida en numerosas “celdas”. Así, es posible obtener una fotografía, compuesta por un conjunto de pequeñas imágenes o imágenes elementales, tantas como número de celdas haya sobre la placa fotosensible. Es importante destacar que la imagen registrada de esta manera sobre la placa fotográfica es una imagen en negativo, por lo que era necesario realizar una copia de la misma sobre una nueva emulsión con el fin de obtener la imagen en positivo.

Por otra parte, el proceso de generación de imágenes 3D se basa en el principio de reversibilidad de los rayos luminosos. De esta forma, iluminando el sistema con luz difusa por detrás (esto es, por el lado de las imágenes elementales registradas), es posible proyectar los rayos luminosos y reconstruir la escena tridimensional (ver Figura 1). Así, un observador situado delante de las lentes a una cierta distancia arbitraria será capaz de visualizar distintas perspectivas del objeto desde diferentes posiciones de observación. Se trata además de una técnica que proporciona imágenes 3D autoestereoscópicas, dado que no se requiere ningún tipo de gafas especiales para su visualización.

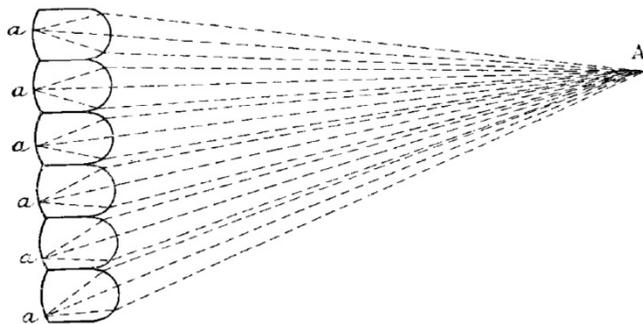


Figura 1. Dibujo original de Lippmann [12] en el que se ilustra el principio de reversibilidad de los rayos luminosos.

Aunque la técnica presenta una gran sencillez conceptual, el propio Lippmann ya apuntó algunas de las dificultades técnicas surgidas en sus experimentos preliminares [13]-[15]. Estas dificultades están asociadas, fundamentalmente, a las precarias propiedades ópticas de los materiales

utilizados en la fabricación de las pequeñas lentes. En 1911, Sokolov llevó a cabo un experimento utilizando una matriz de estenopes o pequeños agujeros para registrar las distintas imágenes elementales. A pesar de que esta solución no es del todo satisfactoria, puesto que se reduce bruscamente la cantidad de luz recogida resultando en unas imágenes relativamente oscuras, el experimento le sirvió a Sokolov para verificar la técnica propuesta por Lippmann, proporcionando además una completa descripción matemática de la misma [16]. En los años posteriores, científicos como H. E. Ives [17] o D. F. Coffey [18] llevaron a cabo diferentes modificaciones del sistema original de Lippmann. Concretamente, sugirieron la incorporación de una lente de campo con el fin de formar la imagen del objeto en las proximidades de la matriz de microlentes [19]. En 1992, E. H. Adelson y J. Y. A. Wang construyeron la primera cámara basada en el diseño propuesto por Coffey [20], dando lugar al desarrollo de una técnica de captura y reproducción de imágenes 3D que se conoce actualmente bajo diferentes nombres, siendo el de *Imagen Integral* el más habitual y el que utilizaremos a lo largo de esta Tesis.

En la actualidad, son muchas y muy variadas las aplicaciones en las que se usa la tecnología de imagen integral [21]-[30]. La aplicación más directa está relacionada con la proyección de imágenes sobre un monitor sobre el que se superpone una matriz de microlentes, proporcionando imágenes 3D que pueden visualizarse sin necesidad de utilizar ningún dispositivo de visión adicional [31]-[33]. En este sentido, son muchos los avances desarrollados en los últimos años que han permitido mejorar la resolución, el ángulo de visión o la profundidad de campo del sistema de proyección de imágenes, entre otros aspectos. Otra de las aplicaciones, también de gran importancia reside en la posibilidad de recuperar la información en profundidad de una escena 3D, a través de la información registrada tras una única captura [34]-[39], realizando así una reconstrucción volumétrica de la misma [40]-[42].

Debido a la gran versatilidad de la técnica de imagen integral, una de las aplicaciones que recientemente ha despertado el interés de numerosos científicos es la de su adaptación en el campo de la microscopía, donde la obtención de la información en profundidad de una cierta muestra resulta particularmente interesante [43]. Aunque los sistemas de microscopía 3D han

experimentado un rápido desarrollo en los últimos años, la obtención de imágenes tridimensionales se consigue combinando, tras un proceso secuencial de barrido plano a plano, las imágenes bidimensionales de las diferentes secciones de la muestra, lo que conlleva, en la mayoría de los casos, prolongados tiempos de captura. Esto constituye el principal inconveniente en la obtención de imágenes de muestras vivas. Existen sin embargo otras técnicas capaces de recuperar la información 3D de una muestra a través de la información registrada tras una única captura. Una de estas técnicas es la microscopía holográfica digital (*DHM*, del inglés *digital holographic microscopy*) [44],[45] en la que se registra un holograma de la muestra, a partir del cual es posible recuperar la información de la amplitud compleja de la misma en diferentes planos. El principal inconveniente de esta técnica es que requiere una iluminación coherente, lo que conlleva problemas de diferente naturaleza. Una alternativa consiste en la utilización de luz incoherente, bien sea en la iluminación o en la respuesta de la muestra a la luz, como es el caso de la fluorescencia. En este último caso, la información 3D puede extraerse a partir de una única imagen [46],[47]. Por su parte, la tecnología de Imagen Integral ofrece la posibilidad de obtener imágenes correspondientes a diferentes profundidades de una muestra bajo iluminación incoherente, y mediante una única captura.

De esta forma, podemos decir que los objetivos de esta Tesis son diversos pero presentan un elemento común; la obtención de imágenes de alta resolución mediante sistemas de microscopía de imagen integral. Para ello, en primer lugar se analizarán las principales características de los sistemas de captura de imagen integral. Esto nos permitirá establecer las bases de la adaptación de la técnica al campo de la microscopía, o, dicho de otra manera, analizar los principios de la microscopía integral. Presentaremos también cuáles son los principales inconvenientes de la técnica y propondremos algunas soluciones para cada uno de ellos. Por otra parte, se analizarán también las características relativas al proceso de reconstrucción de la información 3D. En este sentido, presentaremos un nuevo algoritmo para mejorar diferentes aspectos de las imágenes reconstruidas, en relación a los métodos tradicionales.

El desarrollo de los objetivos que acabamos de mencionar se llevará a cabo de acuerdo con la siguiente organización. En el Capítulo 2 se establecerá el marco teórico de los sistemas de Imagen Integral, donde se analizará el proceso de registro de la información espacial y angular de una cierta escena 3D, así como el proceso de reconstrucción en profundidad de la misma. En el Capítulo 3 presentaremos la configuración básica de un microscopio de Imagen Integral, así como sus principales limitaciones en comparación con las imágenes proporcionadas por un microscopio convencional. En los Capítulos 4, 5 y 6, propondremos algunas soluciones para cada una de estas limitaciones. En el Capítulo 7 se mostrará un nuevo algoritmo propuesto para llevar a cabo la reconstrucción computacional de escenas extensas. Finalmente en el Capítulo 8 expondremos las diferentes conclusiones derivadas del presente trabajo.

Capítulo 2

Fundamentos de los Sistemas de Imagen Integral

En este capítulo se expondrán los conceptos básicos a partir de los cuales se desarrolla esta Tesis. Se analizará el concepto de *función plenóptica*, lo que nos permitirá establecer las bases de los distintos tipos de sistemas de captura integral, en el contexto de la Óptica Geométrica.

2.1. La función plenóptica

Consideremos un objeto que, bien por ser auto-luminoso, o bien porque ha sido iluminado mediante algún tipo de fuente externa, irradia luz en todas direcciones. De acuerdo con el *principio de Huygens*, cada punto del objeto se comportará como un emisor secundario de ondas esféricas. La dirección de propagación de la energía radiante puede establecerse a través del concepto geométrico de *rayo*. Así, siempre que el medio de propagación sea un medio homogéneo e isótropo, los rayos pueden representarse mediante un conjunto de líneas rectas perpendiculares, en cada punto, a los frentes de onda [48]. De esta forma, cada punto del espacio es atravesado por una gran cantidad de rayos luminosos que provienen de todos los puntos del objeto. A la función que recoge la información espacio-angular de esta distribución total de luz en el espacio se le denomina *función plenóptica* [49], también llamada por algunos autores como *light field*³ [50]. Físicamente, la función

³ El término *light field* fue acuñado por A. Gershun en 1936 en su publicación acerca de las propiedades radiométricas de la luz [52].

plenóptica no es otra cosa que la distribución total de radiancia, magnitud radiométrica fundamental que se utiliza para describir el flujo radiante por unidad de área y por unidad de ángulo sólido que emerge de una superficie en una dirección determinada [53]. Su unidad de medida es el $W / (sr m^2)$ y, siguiendo la nomenclatura utilizada en radiometría, la denotaremos como L .

2.1.1. Parametrización de la función plenóptica y representación a través del diagrama espacio-angular

Estrictamente, la función plenóptica debe ser considerada como una función en 5D, 3D para las coordenadas espaciales (x, y, z) y 2D para cada dirección del flujo (θ, ϕ) . Habitualmente, la situación de interés es aquella en la que finalmente se pretende coleccionar los rayos que se propagan, básicamente, siguiendo una dirección a la que asignamos la coordenada espacial z . En este caso y suponiendo que no existen elementos oclusores o difusores que modifiquen la trayectoria de los rayos, la radiancia permanece invariante a lo largo de la dirección z . Esta redundancia permite simplificar la función plenóptica y considerarla únicamente como una función 4D [50],[54], de manera que, en el espacio libre, $L = L(x, y, \theta, \phi)$. Cabe mencionar que la parametrización de la función plenóptica que acabamos de presentar no es única. Algunos autores realizan la llamada “parametrización con dos planos”, que surge de considerar las coordenadas espaciales de los rayos luminosos en su intersección con dos planos arbitrarios y paralelos entre sí. Este tipo de parametrización es muy usada comúnmente por los grupos de trabajo de computación gráfica [50]. Sin embargo, creemos que la parametrización a través de un único plano es mucho más intuitiva, al considerar que un rayo queda unívocamente definido a través de las coordenadas (x, θ) que representan, respectivamente, la posición e inclinación del rayo luminoso en su intersección con un plano transversal al eje óptico [51] (ver Figura 2 (a)).

Una manera especialmente útil de representar la distribución de radiancia o función plenóptica sobre un cierto plano de referencia, es a través de los llamados *diagramas espacio-angulares*. Por simplicidad, en los diferentes diagramas que ilustran esta Tesis se mostrará un corte 2D de la función

plenóptica, tal y como se hace en la Figura 2 (b) ⁴. De esta forma, cada rayo de coordenadas (x, θ) aparece como un punto en el diagrama y representa, en última instancia, el valor de la radiancia transportada por dicho rayo.

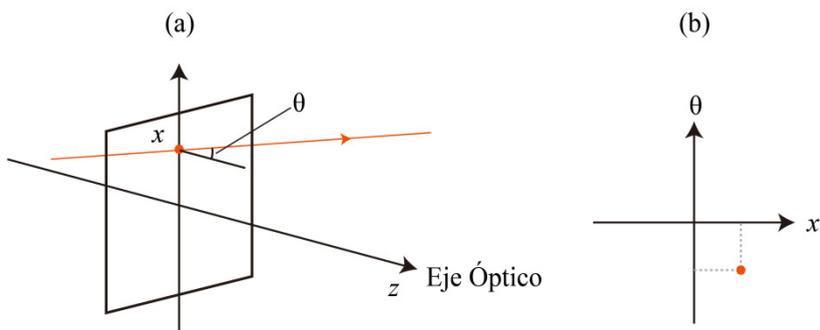


Figura 2. (a) Parametrización de la función plenóptica a través de las coordenadas (x, θ) de un cierto rayo luminoso. (b) Representación en el diagrama espacio-angular de la función plenóptica asociada a dicho rayo.

2.1.2. Transformaciones de la función plenóptica

Conocida la distribución de radiancia o función plenóptica en un determinado plano transversal al eje óptico, resulta interesante analizar cómo se modifica esta función como consecuencia de las distintas transformaciones sufridas por los rayos luminosos que atraviesan el sistema. Estas transformaciones surgen como consecuencia de la propagación de los rayos en el espacio libre, o bien tras atravesar algún elemento óptico. En cualquier caso, siempre que el elemento óptico en cuestión no produzca una disipación de la energía, es posible afirmar que la función plenóptica se

⁴ En el desarrollo de esta Tesis se considerará que un ángulo tiene signo positivo cuando al llevar la recta que lo define al eje principal por el camino angular más corto, el recorrido se realiza en sentido contrario a las agujas del reloj. Por su parte, las distancias axiales se considerarán positivas si siguen el sentido de incidencia de la luz, el cual, en términos generales se considerará de izquierda a derecha.

conserva, de manera que cada rayo preserve el valor de su radiancia asociada. Esto puede expresarse como

$$L(x', \theta') = L(x, \theta), \quad (2.1)$$

siendo (x, θ) y (x', θ') las coordenadas que definen al rayo luminoso antes y después del proceso de transformación, respectivamente.

En el contexto de la Óptica Geométrica es posible expresar las nuevas coordenadas en función de las coordenadas originales, a través de una transformación lineal, de manera que

$$\begin{pmatrix} x' \\ \theta' \end{pmatrix} = A \begin{pmatrix} x \\ \theta \end{pmatrix}, \quad (2.2)$$

siendo A la *matriz de transferencia* del sistema [55].

Resultan particularmente interesantes dos tipos de transformaciones. En primer lugar, consideraremos la propagación en el espacio libre de un rayo luminoso (ver Figura 3 (a)). Tal y como puede verse en la figura, puesto que el rayo mantiene su dirección original, la transformación únicamente produce un cambio en la coordenada espacial. La matriz de transferencia asociada a esta *traslación* puede expresarse como

$$T = \begin{pmatrix} 1 & -t \\ 0 & 1 \end{pmatrix}, \quad (2.3)$$

siendo t la distancia de propagación. De esta forma, las nuevas coordenadas de la función plenóptica pueden obtenerse a través de la siguiente ecuación:

$$\begin{pmatrix} x' \\ \theta' \end{pmatrix} = T \begin{pmatrix} x \\ \theta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -t \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ \theta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x - t\theta \\ \theta \end{pmatrix}. \quad (2.4)$$

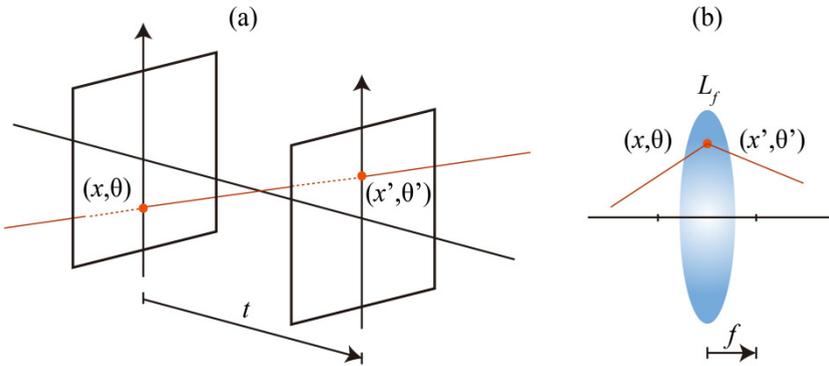


Figura 3. Transformaciones básicas de coordenadas en un sistema óptico como consecuencia de (a) una traslación en el espacio libre y (b) refracción al atravesar una lente de una cierta distancia focal.

Por otra parte, en la Figura 3 (b) se muestra la refracción sufrida por un rayo al atravesar una lente delgada convergente de distancia focal f . En este caso, la matriz de transferencia del sistema será

$$L_f = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 1/f & 1 \end{pmatrix}, \quad (2.5)$$

de manera que las nuevas coordenadas de la función plenóptica vendrán dadas por

$$\begin{pmatrix} x' \\ \theta' \end{pmatrix} = L_f \begin{pmatrix} x \\ \theta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 1/f & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ \theta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x \\ x/f + \theta \end{pmatrix}. \quad (2.6)$$

Tal y como se desprende de la ecuación anterior, la transformación implica únicamente un cambio en la dirección de los rayos puesto que la coordenada espacial permanece inalterada (ver Figura 3 (b)).

De esta forma, la matriz de transferencia de cualquier sistema óptico puede representarse como una combinación, en forma de producto de matrices, de las transformaciones básicas de traslación y refracción que acabamos de exponer.

2.2. El problema de la cámara fotográfica convencional

Una cámara fotográfica es un instrumento óptico capaz de registrar la imagen de un cierto objeto [53]. Toda cámara está compuesta, esencialmente, por un objetivo fotográfico⁵ y un elemento fotosensible.

Un objetivo fotográfico es un sistema óptico convergente compuesto por un conjunto de lentes que proporcionan una imagen real del objeto. Por simplicidad, es posible representar el objetivo a partir de sus planos principales, tal y como puede verse en la Figura 4. De esta forma, el sistema formará una imagen real del objeto a una cierta distancia a' , de manera que se cumpla la *ecuación de conjugación de Gauss* o ecuación de las lentes

$$-\frac{1}{a} + \frac{1}{a'} = \frac{1}{f}. \quad (2.7)$$

Nótese que si el objeto posee extensión axial, es necesario definir un plano de referencia objeto (PRO) situado a una distancia a tal que se satisfaga la ecuación de conjugación.

Por otra parte, el registro de la imagen se realiza mediante un elemento fotosensible (típicamente una emulsión fotográfica en fotografía analógica, o un sensor de imagen electrónico en el caso de la fotografía digital), colocado sobre el plano imagen del sistema. A lo largo de esta Tesis únicamente se considerarán sensores electrónicos puesto que nos limitaremos al caso de la fotografía digital, por otra parte, la más habitual hoy en día.

Llegados a este punto, resulta interesante analizar la función plenóptica sobre el plano de registro en una cámara fotográfica. Puesto que sobre cada punto del plano imagen inciden infinitos rayos luminosos con diferentes inclinaciones, la representación del diagrama espacio-angular en dicho plano corresponderá a una distribución continua de puntos, tanto en la componente

⁵ A excepción de la cámara estenopeica, la cual está desprovista de objetivo fotográfico.

espacial como en la angular. Sin embargo, puesto que sobre el plano imagen se sitúa un sensor cuyos píxeles, lejos de ser infinitesimales, presentan un cierto tamaño Δx , la representación del mapa de radiancia en el plano del sensor presentará la distribución mostrada en la Figura 5 (a).

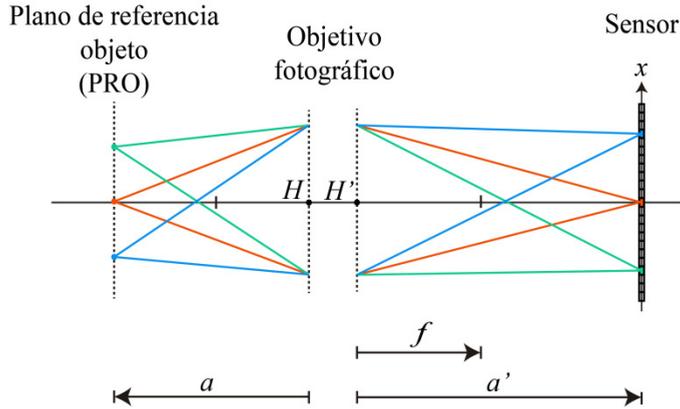


Figura 4. Esquema simplificado de una cámara fotográfica convencional. El objetivo fotográfico se ha representado de acuerdo a sus planos principales, definidos a partir de la posición axial de H y H' .

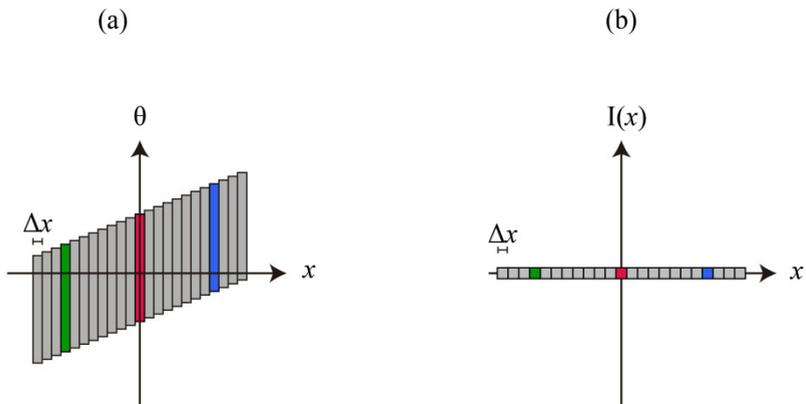


Figura 5. (a) Representación de la función plenóptica en el plano de registro de la imagen. (b) Integración angular realizada por los píxeles contenidos en el sensor.

Existe una pérdida de información intrínseca a este tipo de sistemas debido a la presencia del elemento fotosensible, en lo sucesivo, sensor. Más concretamente, la información angular del sistema no puede ser preservada puesto que los píxeles que componen el sensor llevan a cabo la integración de todos los rayos luminosos que inciden sobre ellos. Dicho de otra manera, la distribución de intensidad de la fotografía registrada en el sensor es el resultado de la integración de la función plenóptica de acuerdo con la siguiente ecuación

$$I(x, y) = \iint L(x, y, \theta, \phi) d\theta d\phi. \quad (2.8)$$

Esta situación puede verse reflejada en la Figura 5 (b). En consecuencia, la fotografía registrada mostrará una imagen nítida de aquellas regiones del objeto 3D contenidas en el PRO, pero también información borrosa o desenfocada del resto de planos. De esta forma, la incapacidad del sensor de preservar la información direccional de los rayos provoca que, en consecuencia, no sea posible recuperar, *a posteriori*, la estructura tridimensional de una escena, esto es, la posición axial de los distintos planos que la componen⁶.

2.3. Captura de la información angular de escenas tridimensionales

De acuerdo con lo expuesto en la sección anterior, los sistemas de captura convencionales no permiten registrar adecuadamente la distribución de radiancia de escenas tridimensionales, puesto que únicamente nos proporcionan información del objeto sobre un único punto de vista, como consecuencia de la integración angular dada por la ecuación 2.8. Es por ello que resulta necesario emplear un sistema de captura alternativo, que preserve la información angular de la escena.

⁶ En realidad, existen técnicas de computación gráfica que permiten recuperar cierta información 3D a partir del grado de desenfoco de las imágenes de partes de la escena situadas lejos del PRO.

De acuerdo con las ideas de F. Ives [11] y G. Lippmann [12], los sistemas de imagen integral introducen un conjunto de microlentes en el plano imagen del sistema fotográfico convencional. De esta forma se consigue que los rayos luminosos que forman ángulos diferentes con respecto al eje óptico, incidan sobre píxeles distintos del sensor, el cual se ha desplazado una cierta distancia detrás del plano de las microlentes.

A continuación se presentan las distintas configuraciones posibles en un sistema de imagen integral, así como las características principales de cada una de ellas.

2.3.1. Sistemas de Imagen Integral de campo cercano

2.3.1.1. Configuración del sistema

En la Figura 6 (a) se muestra el esquema de un sistema de imagen integral de campo cercano. La configuración básica de este tipo de sistemas incluye una matriz de microlentes (MLA, del inglés *microlens array*), situada a una cierta distancia g del plano de referencia objeto. Nótese que por claridad en la representación, la escala de las microlentes no ha sido preservada en la figura. Cada punto del PRO emite rayos luminosos que inciden sobre las microlentes, alcanzando los píxeles de un sensor de imagen situado a una distancia g' . De esta forma, el plano de referencia objeto y el plano del sensor formarán un par de planos conjugados a través de las microlentes, de manera que se satisface la ecuación de Gauss

$$-\frac{1}{g} + \frac{1}{g'} = \frac{1}{f_{ML}}, \quad (2.9)$$

siendo f_{ML} la distancia focal de las microlentes.

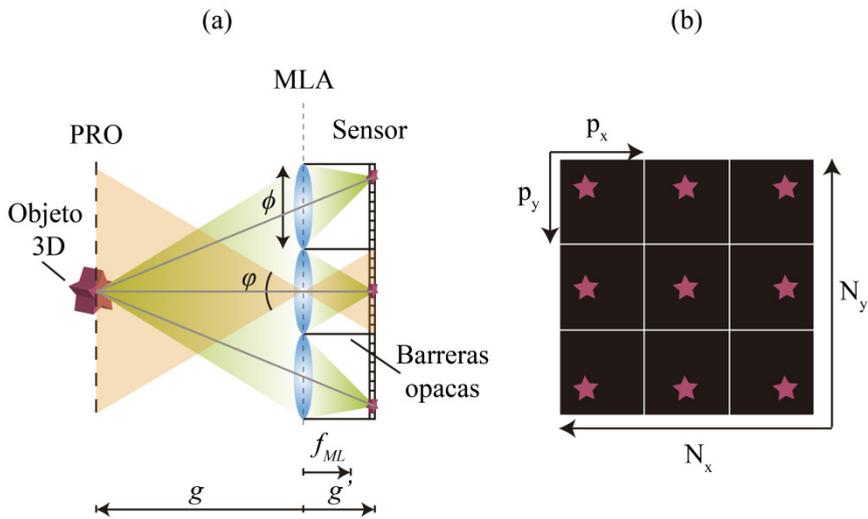


Figura 6. (a) Esquema de un sistema de imagen integral de campo cercano. (b) Imagen integral registrada por el sensor. La imagen integral está compuesta por un conjunto de $N_x \times N_y$ imágenes elementales con $p_x \times p_y$ píxeles cada una de ellas.

Así, cada microlente formará sobre el sensor una imagen enfocada de una cierta región del plano de referencia objeto. Las imágenes formadas por cada una de las microlentes reciben el nombre de *imágenes elementales* (EI, del inglés *elemental images*), que constituyen, en esencia, diferentes vistas o perspectivas de la escena tridimensional. De esta forma, la *imagen integral* capturada por el sensor estará compuesta por tantas imágenes elementales, o vistas, como microlentes haya en la matriz (ver Figura 6 (b)). Nótese que para evitar el solapamiento entre las distintas imágenes elementales registradas en el sensor, es necesario limitar el campo visual de las microlentes. Para ello, se introducen en el sistema unas barreras opacas que delimitan el tamaño del sensor empleado en la captura de cada imagen elemental (ver Figura 6 (a)). El campo visual de las microlentes queda entonces definido como $\varphi = \phi / 2f_{ML}$, siendo ϕ el diámetro de las microlentes ⁷.

⁷ Suponiendo microlentes circulares, a lo largo de esta Tesis se considerará que el diámetro ϕ de las microlentes es igual al período p de las mismas, siendo éste el

Otro aspecto de gran importancia en los sistemas de captura de imagen integral es el paralaje entre las distintas EIs, entendido éste como la diferencia en la posición relativa que ocupan los objetos en las imágenes elementales. De esta forma, cuanto menor sea la distancia entre el objeto y la MLA, mayor será el paralaje existente en las imágenes elementales. Sin embargo, para que exista paralaje es necesario que cada punto del plano de referencia objeto sea muestreado, al menos, por dos microlentes contiguas de la matriz. Fijada la posición del sensor, esto implica necesariamente que la escena debe situarse a una distancia mínima de la MLA. A partir de la Figura 6 (a) es fácil comprobar que

$$g_{\min} = -g' . \quad (2.10)$$

Aunque los sistemas de imagen integral de campo cercano se han presentado según el esquema de la figura anterior, donde se utiliza una matriz de microlentes para capturar la función plenóptica de una escena 3D, es importante mencionar que ésta no es la única posibilidad. Una alternativa consiste en sustituir la matriz de microlentes y el sensor, por un conjunto de cámaras digitales, tantas como imágenes elementales se quiera capturar, dispuestas de manera equidistante a lo largo de las direcciones transversales x e y [56]. Sin embargo, para evitar el elevado coste que puede suponer la adquisición de un gran número de cámaras, siempre que la escena de interés sea una escena estática es posible realizar la captura de la imagen integral mediante el llamado método de apertura sintética [57],[58], que consiste en utilizar una única cámara digital, desplazada a lo largo de las dos direcciones transversales para registrar las distintas vistas o imágenes elementales de la escena.

parámetro que define la distancia entre los centros de dos microlentes que ocupan posiciones contiguas en la matriz.

2.3.1.2. Representación de la función plenóptica capturada por un sistema de imagen integral de campo cercano

Llegados a este punto, resulta interesante analizar cómo se representa la función plenóptica capturada, en el correspondiente diagrama espacio-angular. En la Figura 7 (a) se han representado algunas de las microlentes que componen la matriz. Como puede verse, cada microlente separa los rayos luminosos que inciden sobre ella por su centro, de manera que en función de su ángulo de incidencia, la información contenida en cada uno de ellos será registrada por un píxel diferente del sensor. La distribución de radiancia asociada al plano de la MLA puede verse representada en el diagrama de la Figura 7 (b). Tal y como puede observarse, la función plenóptica queda muestreada mediante un conjunto de puntos equidistantes. Puesto que en nuestro modelo únicamente se tienen en cuenta los rayos que atraviesan el centro de las microlentes, la separación horizontal entre los puntos del diagrama vendrá dada por el período p de las microlentes. Por otra parte, la separación vertical de los puntos que componen la distribución de radiancia queda determinada por la distancia entre los centros de dos píxeles contiguos del sensor, esto es, por el tamaño del píxel Δx , así como por la distancia g' existente entre la matriz de microlentes y el sensor. Nótese, sin embargo, que por simplicidad en la representación, el tamaño del píxel no se ha tenido en cuenta.

De acuerdo con la Figura 7 (b), la información contenida dentro de una imagen elemental puede identificarse como una columna en el diagrama o, dicho de otra manera, cada columna se corresponde con el conjunto de rayos que inciden sobre una misma microlente.

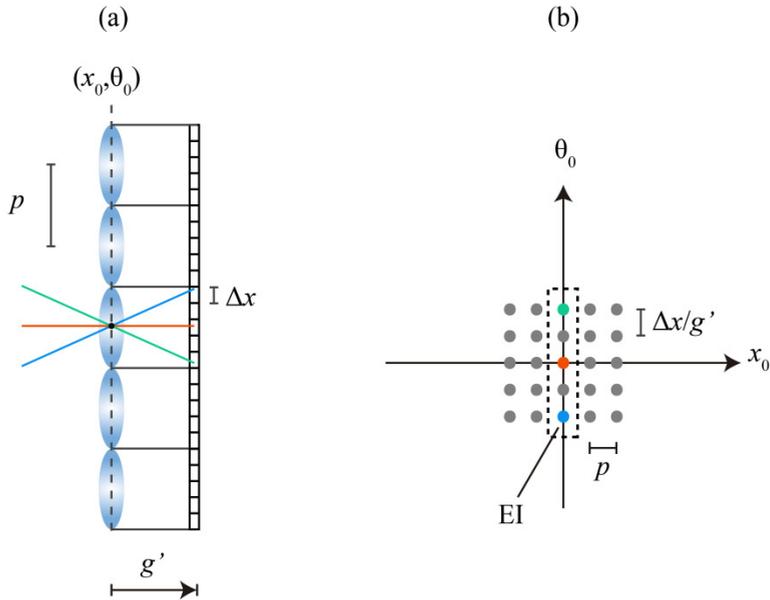


Figura 7. Captura de la información espacio-angular en un sistema de imagen integral de campo cercano. (a) cada microlente separa los rayos que inciden sobre ella por su centro en función de su inclinación, haciéndolos incidir sobre píxeles diferentes del sensor. (b) Diagrama espacio-angular de la función plenóptica en el plano de la MLA.

2.3.1.3. Resolución espacial y angular en un sistema de imagen integral de campo cercano

Cuando se habla de resolución en un sistema de imagen integral, debe hacerse una distinción entre la resolución angular y la resolución espacial.

La resolución angular de un sistema de imagen integral está determinada por el número de vistas de un objeto 3D que el sistema es capaz de capturar. Si suponemos que toda la región de interés de la escena 3D es capturada por todas las lentes de la MLA, la resolución angular queda entonces definida por el número de microlentes contenidas en la matriz. Complementariamente, el límite de resolución angular está determinado por la separación angular entre las diferentes vistas, medida desde el punto central del PRO. Por otra parte, hay que tener en cuenta que los sensores de imagen cuentan con un número

finito de elementos fotosensibles o píxeles. Puesto que el plano del sensor se encuentra conjugado con el plano de referencia objeto a través de la MLA, la frecuencia de muestreo del objeto, y, por tanto, la resolución espacial del sistema, será tanto mejor cuanto menor sea el tamaño de los píxeles contenidos en cada una de las imágenes elementales.

Hay que tener en cuenta que el número de píxeles contenidos bajo cada una de las microlentes está perfectamente definido a partir del diámetro ϕ de éstas, y del tamaño del píxel Δx . De esta forma, la resolución total (es decir, el producto entre la resolución angular y la resolución espacial) del sistema de imagen integral queda definida por el número de píxeles totales contenidos en el sensor. De cómo se distribuyan estos píxeles dependerá, por tanto, obtener una mayor resolución angular y una menor resolución espacial o viceversa. Así, mientras que en un sistema de captura convencional la totalidad de los píxeles del sensor contribuyen al muestreo espacial del objeto, en los sistemas de imagen integral la resolución espacial se va a ver reducida en favor de la resolución angular o direccional.

2.3.1.4. Profundidad de campo en un sistema de imagen integral de campo cercano

Tal y como se ha visto en la sección anterior, cada una de las microlentes contenida en la matriz generará sobre el sensor, una imagen elemental perfectamente enfocada de un plano de la escena 3D, de acuerdo con la ecuación 2.7. Se deduce, por tanto, que las regiones de la escena tridimensional situadas en planos que no satisfagan la relación de conjugación sufrirán un cierto desenfoque en la imagen final debido a que para estas regiones el plano imagen no coincide con el plano del sensor. Este desenfoque puede ser cuantificado a través del *círculo de confusión*. No obstante, puesto que el registro se realiza con sensores digitales, en los cuales los píxeles poseen un cierto tamaño, es posible considerar que la imagen de un objeto situado en un cierto plano será capturada nítidamente siempre que el tamaño del radio del círculo de confusión sea menor que el tamaño del píxel del sensor. La profundidad de campo del sistema *DOF* (del inglés, *depth of field*), esto es, la longitud del intervalo axial cuya imagen será registrada nítidamente por el sensor, puede expresarse como [53]

$$DOF = \frac{2\phi g \Delta x M}{\Delta x^2 - M^2 \phi^2}, \quad (2.11)$$

donde Δx hace referencia al tamaño del píxel y $M = g'/g$ es el aumento lateral entre el plano de referencia objeto y el plano del sensor (ver Figura 8). De esta forma, todas las regiones del espacio 3D que se sitúen fuera de la profundidad de campo dada por la ecuación 2.11, aparecerán desenfocadas en las imágenes elementales. Dicho de otro modo, para que una cierta región de la escena pueda ser reenfocada tras la aplicación de los correspondientes algoritmos, ésta debe de estar contenida dentro del intervalo axial definido por DOF .

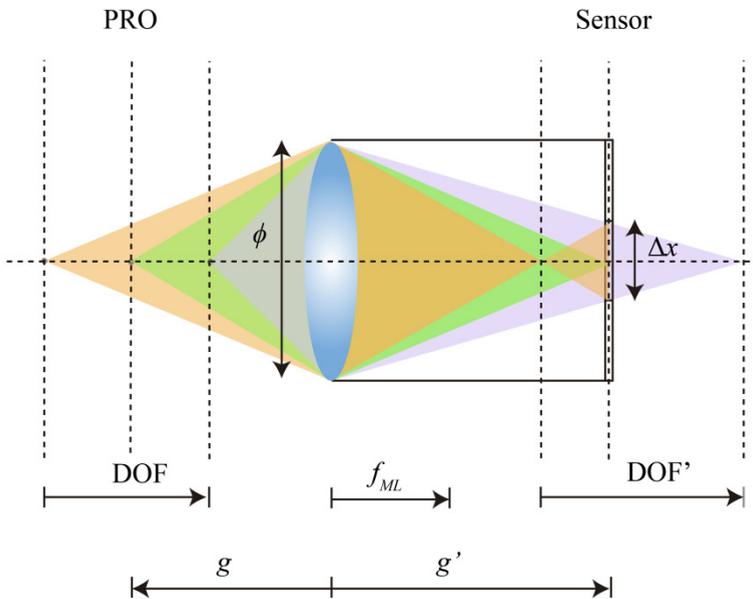


Figura 8. Delimitación de la profundidad de campo de las microlentes presentes en un sistema de imagen integral de campo cercano.

2.3.2. Sistemas de Imagen Integral de campo lejano

2.3.2.1. Configuración del sistema

Hasta ahora hemos considerado sistemas de imagen integral de campo cercano en los que, tal y como su nombre indica, la escena se sitúa cerca de la MLA, de manera que la extensión angular de la matriz vista desde el objeto es relativamente grande. Sin embargo, cuando la escena 3D que se quiere registrar se encuentra lo suficientemente lejos de la matriz de microlentes, la extensión angular de la misma es entonces muy pequeña, como también pequeño es el paralaje presente en las EIs. Por todo ello, resulta necesario introducir en el sistema una lente de campo LC de diámetro ϕ_{LC} y distancia focal f_{LC} , de manera que la imagen de la escena 3D se sitúe en las proximidades de la MLA [59].

En la Figura 9 se muestra el esquema de un sistema de captura de imagen integral de campo lejano. Ahora, el PRO se encuentra conjugado con el plano de las microlentes a través de la lente de campo, cumpliéndose la relación de conjugación

$$-\frac{1}{a} + \frac{1}{a'} = \frac{1}{f_{LC}}, \quad (2.12)$$

siendo a y a' las distancias entre el plano de la LC y el plano en el cual se sitúa el PRO y la MLA, respectivamente. Por otra parte, cada una de las microlentes proporcionará sobre el sensor una imagen enfocada de la apertura de la lente de campo. De nuevo, se satisface la ecuación de Gauss para la pareja de planos formada por el plano de la LC y el plano del sensor:

$$-\frac{1}{g} + \frac{1}{g'} = \frac{1}{f_{ML}}, \quad (2.13)$$

con g y g' las distancias entre la MLA y el plano de la LC y del sensor, respectivamente. Puesto que la focal de las microlentes suele ser muy pequeña en comparación con la focal de la lente principal, se puede

considerar, en buena aproximación, que la separación del sensor con el plano de la MLA es tal que $g' = f_{ML}$ [60].

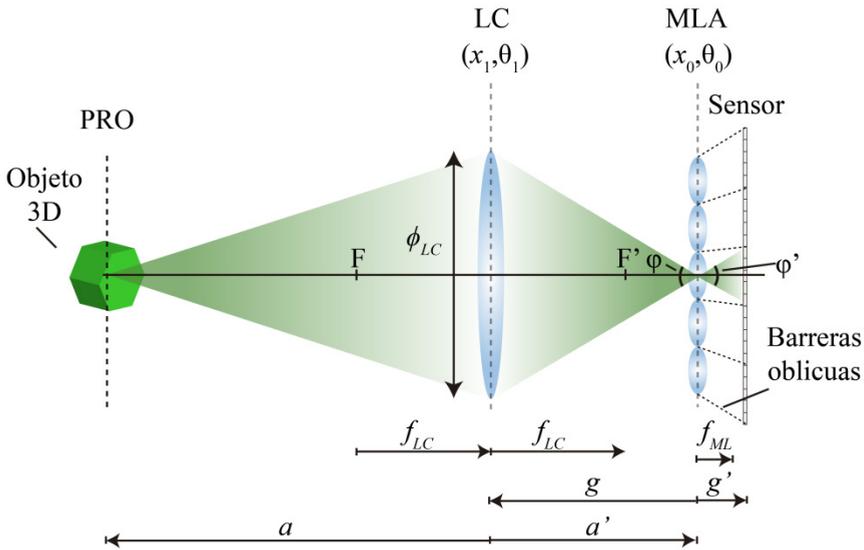


Figura 9. Esquema de un sistema de captura de imagen integral de campo lejano. El PRO se encuentra conjugado con el plano de las microlentes a través de la lente de campo. Por otra parte, el plano en el cual se sitúa la LC se encuentra conjugado con el plano del sensor a través de la MLA.

Al igual que ocurre en un sistema de imagen integral de campo cercano, el sensor realiza el registro de la información tridimensional de la escena, esto es, la información espacial y angular de la misma a través de una imagen 2D que, por analogía con el caso anterior llamaremos también *imagen integral*. Sin embargo, en este caso la información contenida en la imagen integral se encuentra ordenada de manera distinta puesto que ahora las microlentes realizan un muestreo espacial del objeto. A las imágenes formadas por cada una de las microlentes en un sistema de imagen integral de campo lejano les llamaremos *microimágenes*.

A modo de ejemplo, en la Figura 10 (a) se muestra una imagen integral obtenida con un sistema de imagen integral de campo lejano como el representado en el esquema de la Figura 9. Como puede apreciarse en la figura, la apariencia de las microimágenes es diferente, en función de la profundidad de los objetos que constituyen la escena. De esta forma, la imagen de aquellas regiones de la escena 3D situadas fuera del PRO, ya sea por delante o por detrás de éste, se situará también en un cierto plano desplazado con respecto al plano de la MLA (ver Figura 11). Así, puesto que en este caso un mismo punto de la escena es visto por varias microlentes, las correspondientes microimágenes tendrán el aspecto mostrado en la Figura 10 (b), algo similar a lo que ocurre en los sistemas de imagen integral de campo cercano. Por el contrario, cuando el objeto se sitúa justo sobre el plano de referencia objeto, cada microimagen contendrá información de un único punto del objeto (ver de nuevo la Figura 11), siendo por tanto estas microimágenes constantes en color, tal y como se aprecia en la Figura 10 (c).

Es importante destacar que, contrariamente a lo que ocurre en los sistemas de imagen integral de campo cercano, en este caso la visualización de las diferentes vistas de la escena no es inmediata, pues requerirá de la aplicación de ciertos algoritmos de reconstrucción, tal y como veremos en la sección 2.4.

Antes de proseguir con el análisis del sistema en la siguiente sección, merece la pena aclarar que los sistemas que aquí hemos denominado como sistemas de imagen integral de campo lejano, son también ampliamente conocidos en la literatura con el nombre de *sistemas plenópticos* [61]. A. Lumsdaine y T. Georgiev rebautizaron a este tipo de sistemas como sistemas plenópticos 1.0, en contraste con la cámara plenóptica 2.0 en la cual el PRO no se encuentra conjugado con el plano de las microlentes sino con otro plano situado a una cierta distancia de éste [62] . De esta forma, cada una de las microlentes contenidas en la matriz proporciona sobre el sensor una imagen enfocada del objeto. No obstante, a pesar de que la configuración 2.0 es también ampliamente utilizada [63],[64] este tipo de sistemas no los trataremos aquí, puesto que presentan algunos inconvenientes bajo nuestro punto de vista, como pueden ser un efecto de viñeteado en las

microimágenes capturadas, así como una disminución de la resolución angular en favor de la resolución espacial que, creemos, no está justificada.

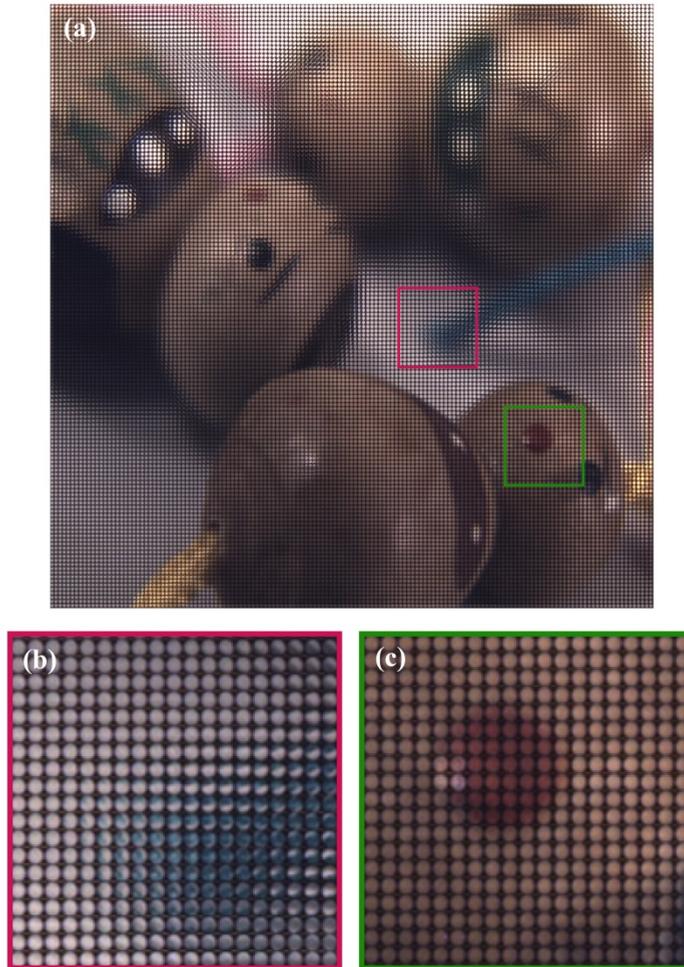


Figura 10 (a) Imagen integral capturada por un sistema de imagen integral de campo lejano. La imagen consta de 147×147 microimágenes, con 10×10 píxeles cada una de ellas. En (b) y (c) se muestran algunas microimágenes registrando la información de las regiones de la escena que se encuentran fuera del PRO y justo en el PRO, respectivamente.

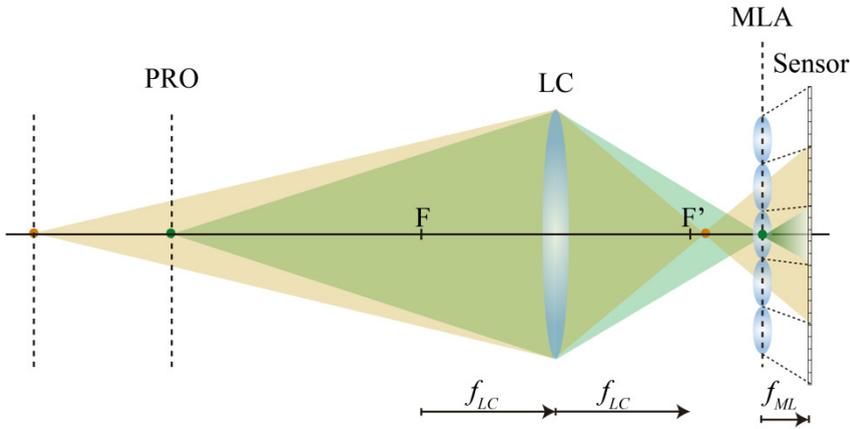


Figura 11. Captura de la información de un escena 3D por la MLA. El muestreo que realizan las microlentes contenidas en la matriz depende de la posición del objeto con respecto al PRO.

2.3.2.2. Delimitación del campo visual de las microlentes en un sistema de imagen integral de campo lejano

Tal y como hemos visto en la sección anterior, en un sistema de imagen integral de campo lejano el plano del sensor está conjugado con el plano de la lente de campo. De esta forma, cada una de las microlentes proporcionará una imagen enfocada de la apertura de la LC, de acuerdo con la ecuación 2.13. Para que las microimágenes sean registradas adecuadamente, es necesario que el campo visual de la lente de campo en el espacio imagen coincida con el campo visual de las microlentes, o lo que es lo mismo, que los ángulos φ y φ' sean iguales (ver Figura 9) [18],[64]. Esta condición puede expresarse matemáticamente como

$$\frac{\phi_{LC}}{-g} = \frac{\phi}{f_{ML}}, \quad (2.14)$$

y su efecto sobre las microimágenes capturadas puede verse reflejado en la Figura 12 (a). Tal y como puede observarse, cuando el campo angular de la LC y las microlentes coincide ($\varphi = \varphi'$), las microimágenes son círculos

tangentes entre sí. Por el contrario, si $\varphi < \varphi'$, habrá huecos entre las microimágenes (ver Figura 12 (b)), de manera que no se produce un correcto aprovechamiento de los píxeles del sensor. Finalmente, en la Figura 12 (c) puede verse que cuando $\varphi > \varphi'$ las microimágenes solapan, perdiéndose también parte de la información. Nótese que el cumplimiento de la ecuación 2.14 evita la introducción de barreras físicas que delimiten las regiones del sensor involucradas en la captura de cada microimagen. Debido al efecto del viñeteado, en un sistema de imagen integral de campo lejano están presentes de manera natural un conjunto de barreras oblicuas, tal y como puede verse en la Figura 9.

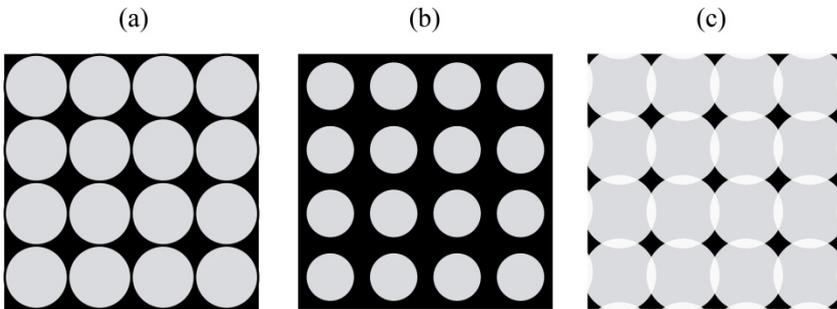


Figura 12. Registro de las microimágenes en un sistema de imagen integral de campo lejano cuando (a) $\varphi = \varphi'$, (b) $\varphi < \varphi'$ (c) $\varphi > \varphi'$.

2.3.2.3. Resolución espacial y angular en un sistema de imagen integral de campo lejano

Para entender cuáles son los factores que limitan la resolución, tanto espacial como angular, en un sistema de imagen integral de campo lejano, debe tenerse en cuenta la configuración del sistema, mostrada en la Figura 9. Por un lado, puesto que el PRO y el plano de la MLA forman una pareja de planos conjugados, el período p de las microlentes contenidas en la matriz es quien limita, en este caso, la resolución espacial del sistema de captura. Así, el tamaño equivalente del píxel en el espacio objeto y, por tanto, la frecuencia de muestreo, vendrá dado por el cociente p/M , siendo

$M = a'/a$ el aumento lateral del sistema entre ambos planos conjugados (ver Figura 13).

Por otra parte, dado que las microlentes separan los rayos luminosos que inciden por su centro en función de su inclinación, es inmediato establecer que, en este caso, el número de vistas (y por tanto, la resolución angular) que es posible generar en un sistema de imagen integral de campo lejano queda establecido por el número de píxeles contenido en cada una de las microimágenes. Puesto que el tamaño de las microlentes determina, en última instancia, el número de píxeles del sensor subtendidos por cada una de ellas, es imprescindible escoger cuidadosamente las características de la MLA con el fin de obtener un compromiso aceptable entre la resolución angular o número de vistas del objeto, y la resolución espacial del mismo.

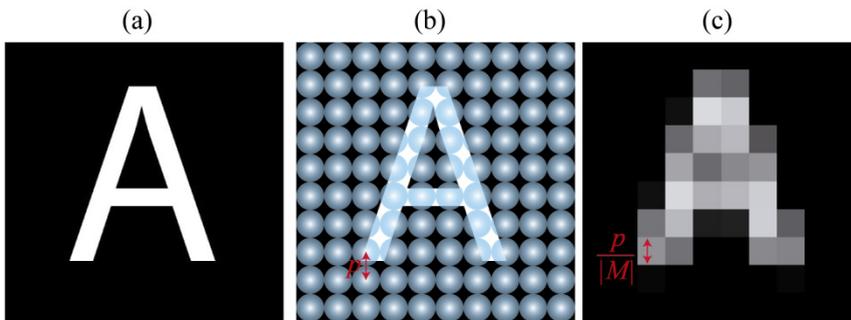


Figura 13. Resolución espacial en un sistema de imagen integral de campo lejano. El PRO se encuentra conjugado con el plano de la MLA. De esta forma, el cociente entre el período p de las microlentes y el aumento lateral del sistema (p/M) determina el tamaño equivalente del píxel en el espacio objeto y, por tanto, la frecuencia de muestreo del mismo. (a) Objeto original. (b) Proyección del objeto sobre el plano de la MLA. (c) Resultado de aplicar un pixelado de tamaño $p/|M|$ al objeto mostrado en (a).

2.3.2.4. Representación de la función plenóptica en un sistema de imagen integral de campo lejano y transformación en el espacio plenóptico

Dado un sistema de captura de imagen integral de campo lejano como el mostrado en la Figura 9, es posible representar la función plenóptica en el plano de la MLA, de coordenadas (x_0, θ_0) de acuerdo con el diagrama espacio-angular mostrado en Figura 14. Nótese que el mapa de radiancia presenta un aspecto cizallado en la componente angular. Esto es debido a que, a diferencia de lo que ocurre en los sistemas de captura de imagen integral de campo cercano, ahora los rayos que inciden sobre los píxeles que ocupan la misma posición en cada una de las microimágenes presentan inclinaciones diferentes. De la misma manera que expusimos en la sección 2.3.1.2, cada columna del diagrama espacio-angular representa la información capturada por una microlente o, en este caso, la información registrada en cada una de las microimágenes (ver Figura 14).

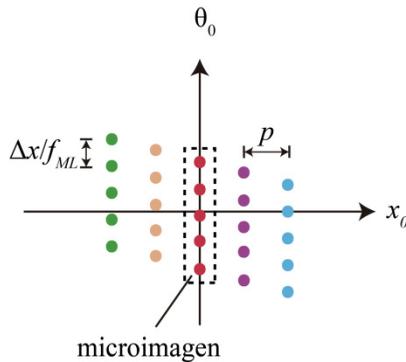


Figura 14. Diagrama espacio-angular de la función plenóptica en el plano de la MLA, para un sistema de imagen integral de campo lejano.

Una vez conocida la función plenóptica en un determinado plano perpendicular al eje óptico, es posible obtener la distribución de radiancia en un plano distinto, de acuerdo a las transformaciones descritas en la sección 2.1.2. Supongamos que queremos obtener la distribución de radiancia en el plano de la lente de campo, de coordenadas (x_1, θ_1) (ver Figura 9). Teniendo

en cuenta las relaciones de transformación dadas por las ecuaciones 2.3 y 2.5, es posible obtener las coordenadas de la función plenóptica en dicho plano como [66]:

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix} = A^{-1} \begin{pmatrix} x_0 \\ \theta_0 \end{pmatrix}, \quad (2.15)$$

siendo A la matriz de transferencia del sistema

$$A = \begin{pmatrix} 1 & -a' \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 1/f_{LC} & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 - a'/f_{LC} & -a' \\ 1/f_{LC} & 1 \end{pmatrix}. \quad (2.16)$$

De esta forma, calculando la matriz inversa A^{-1} es posible obtener las nuevas coordenadas de la función plenóptica a través de la siguiente ecuación:

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & a' \\ -1/f_{LC} & 1 - a'/f_{LC} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_0 \\ \theta_0 \end{pmatrix}. \quad (2.17)$$

En la Figura 15 se muestra el proceso de transformación de coordenadas de la función plenóptica, de acuerdo con la ecuación anterior. Tal y como puede verse en la figura, existe una relación de transposición entre la radiancia representada en el plano de las microlentes, y la radiancia representada en el plano de la LC o dicho de otra manera, entre la información espacial y la información angular registrada en ambos planos.

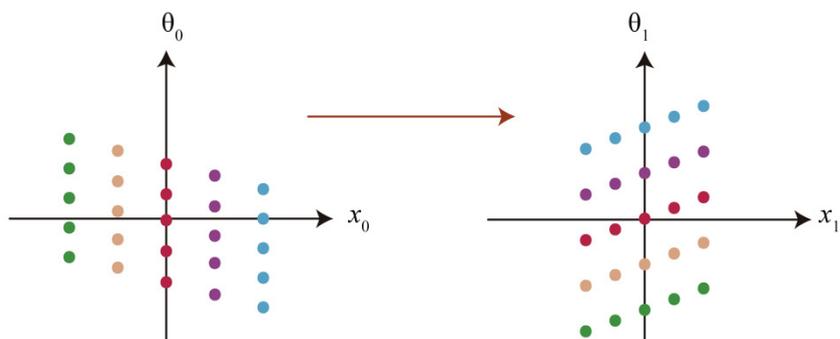


Figura 15. Función plenóptica en un sistema de imagen integral de campo lejano, representada en (a) el plano de la MLA y (b) el plano de la LC.

2.4. Recuperación de la información 3D mediante diferentes algoritmos de reconstrucción

De acuerdo con lo expuesto en las secciones anteriores, los sistemas de captura de imagen integral son capaces de preservar la información tridimensional de una cierta escena. Una vez que esta información ha sido registrada, uno de los principales intereses de la técnica reside en la posibilidad de reconstruir computacionalmente la escena. Para ello, la información contenida en la imagen integral debe ser debidamente procesada con el fin de obtener, por un lado, una reconstrucción de la escena en diferentes profundidades y, por otro, un conjunto de vistas o perspectivas de la misma.

2.4.1. Reconstrucción de la escena en profundidad

La finalidad de la reconstrucción en profundidad es la de *reenfocar*, de manera selectiva, diferentes planos de una escena tridimensional. Dicho de otra manera, la aplicación de los algoritmos adecuados permite cambiar el plano de foco de una cierta escena, después de que ésta haya sido capturada por el sistema.

Consideremos primeramente un sistema de imagen integral de campo cercano. Para entender el algoritmo de reconstrucción, tenemos que pensar en éste como en un proceso de proyección de las imágenes elementales a través de una matriz de estenopes virtual, cuyos parámetros (esto es, período y distancia de separación con respecto al sensor) sean iguales a los de las microlentes presentes en el sistema de captura (ver Figura 16 (a)). Tal y como puede verse en la figura, dado un plano de reconstrucción situado a una distancia z_R de la matriz de estenopes, existe un cierto solapamiento entre las imágenes elementales proyectadas, el cual puede describirse a través del número s de píxeles superpuestos. Definiendo el aumento lateral entre el plano del sensor y el plano de reconstrucción como $|M_{z_R}| = z_R / g'$, es fácil comprobar que la posición axial de este último está relacionada con el número de píxeles superpuestos de la manera siguiente [78]:

$$|M_{z_R}| = \frac{z_R}{g'} = \frac{n}{n-s}, \quad (2.15)$$

siendo n es el número de píxeles por EI. De esta forma, es posible obtener la imagen reconstruida mediante un adecuado desplazamiento de las EIs y posterior suma de los píxeles superpuestos, tal y como se muestra en la Figura 16 (b). Nótese que el número de píxeles q contenido en la imagen reconstruida depende directamente del grado de solapamiento de las EIs (ver Figura 16 (b)), de manera que

$$q = Qn - (Q-1)s, \quad (2.16)$$

donde Q hace referencia al número de microlentes contenido en la matriz⁸.

⁸ Puesto que la imagen correspondiente a cada plano de reconstrucción contiene un número de píxeles diferente como consecuencia del grado de solapamiento de las EIs asociado, será necesario llevar a cabo un proceso de normalización de intensidad de las imágenes obtenidas a través del algoritmo.

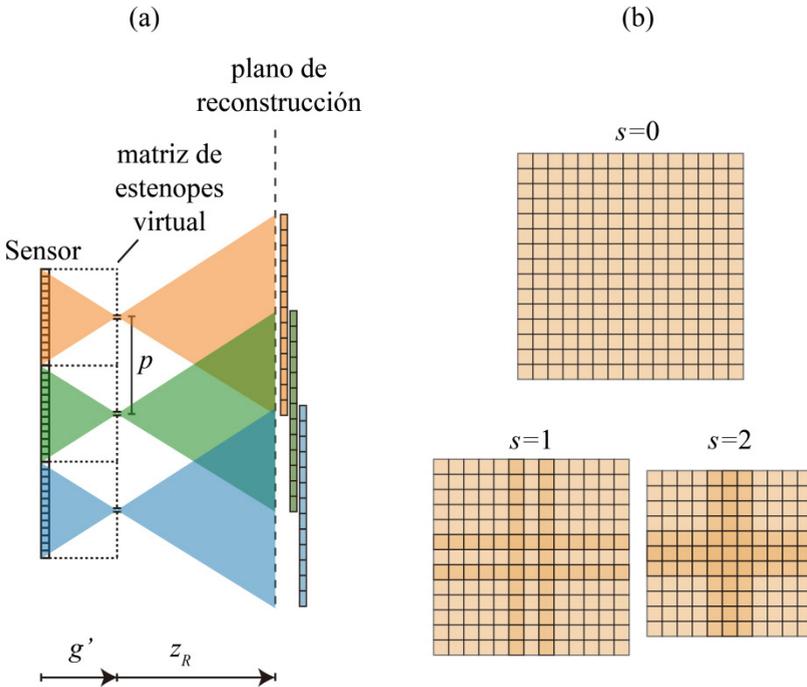


Figura 16. (a) Proceso de reconstrucción de la escena por medio de la proyección de las EIs registradas en el sensor, a través de una matriz de estenopes virtual. (b) El número de píxeles de la reconstrucción depende del número s de píxeles superpuestos.

Resulta interesante analizar el proceso de reconstrucción de acuerdo con la representación de la función plenóptica. Dada la distribución de radiancia en el plano de la MLA de un sistema de captura de imagen integral de campo cercano (Figura 17 (a)), es posible, de acuerdo con las transformaciones expuestas en la sección 2.1.2, obtener la distribución de radiancia en un cierto plano de reconstrucción. En este caso, la transformación que relaciona las coordenadas de la función plenóptica en ambos planos es simplemente una traslación de distancia z_R . En la Figura 17 (b) se representa el correspondiente diagrama espacio-angular. De acuerdo con la ecuación 2.8, la imagen final se obtendrá como resultado de la integración angular de la función plenóptica en el plano de reconstrucción, tal y como se muestra en la Figura 17 (c).

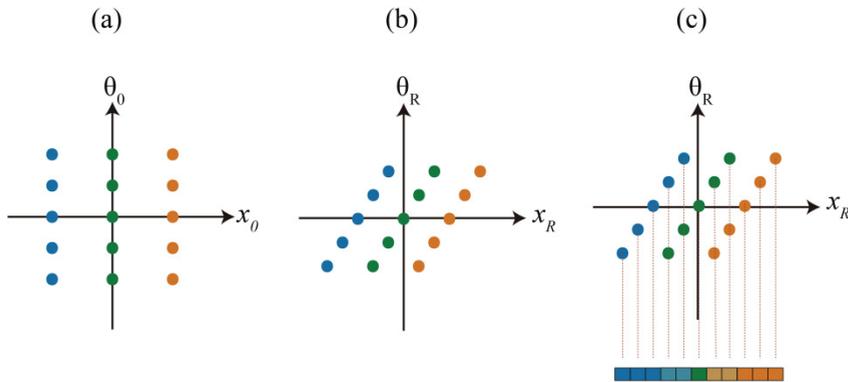


Figura 17. Algoritmo de reconstrucción en profundidad en términos de la función plenóptica.

Es importante destacar que el número de planos en los cuales es posible llevar a cabo la reconstrucción computacional está limitado por el número de píxeles n contenido en cada imagen elemental. Así, resulta inmediato establecer que existirán $n + 1$ planos de reconstrucción, correspondientes a la superposición de los diferentes píxeles en valores pertenecientes al intervalo $s \in [0, n]$. Nótese que de manera implícita se ha considerado que la superposición de los píxeles se lleva a cabo de forma que el parámetro s tome valores enteros, lo que establece una determinada separación axial entre dos planos contiguos de la reconstrucción. Sin embargo, en ocasiones la escena de interés se encuentra situada en posiciones intermedias, por lo que será necesario llevar a cabo la reconstrucción por medio de la superposición de una cierta fracción de píxel.

Cabe destacar que el algoritmo de reconstrucción que acabamos de presentar puede aplicarse de la misma manera para la reconstrucción de una escena capturada mediante un sistema de imagen integral de campo lejano, mediante el solapamiento de los diferentes píxeles que componen las microimágenes registradas en el sensor.

2.4.2. Generación de vistas de la escena 3D

A continuación expondremos el procedimiento para obtener las diferentes vistas capturadas mediante un sistema de imagen integral. Puesto que en un sistema de imagen integral de campo cercano las EIs registradas en el sensor proporcionan directamente el conjunto de perspectivas de la escena, el análisis que realizaremos en esta sección se restringirá al caso de los sistemas de captura de imagen integral de campo lejano.

Tal y como se puso de manifiesto en la sección 2.3.2.3, la relación de conjugación existente entre el plano de la LC y el plano del sensor, en un sistema de imagen integral de campo lejano, permite establecer que la resolución angular del sistema queda determinada por el número total de píxeles contenido dentro de cada microimagen. Así, a partir de las microimágenes registradas en el sensor, es posible generar computacionalmente un conjunto de vistas o perspectivas de la escena 3D [67].

El procedimiento para obtener computacionalmente cada una de estas vistas es conceptualmente muy sencillo, pues se basa en la extracción y composición en forma de imagen 2D, de los píxeles del sensor que ocupan la misma posición relativa en cada una de las microimágenes registradas, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 18. Así, extrayendo píxeles que ocupan posiciones diferentes es posible obtener vistas distintas de la escena. Al conjunto de vistas así generadas les llamaremos *subimágenes*.

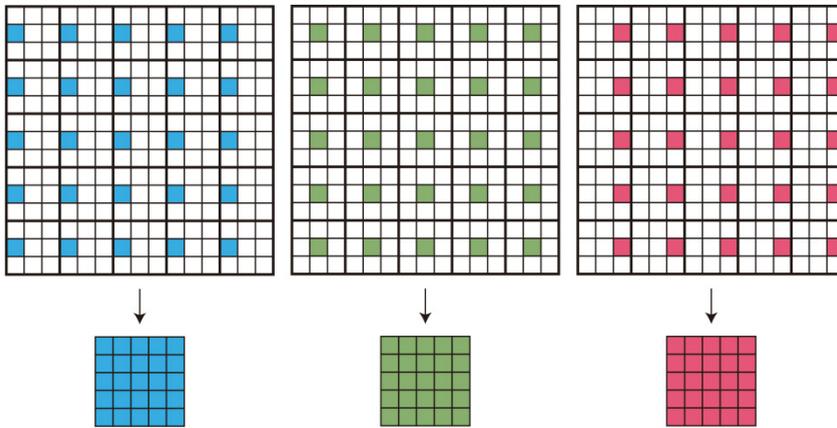


Figura 18. Esquema en el que se muestra el procedimiento para generar las distintas perspectivas a partir de la imagen integral registrada por el sensor.

El fundamento físico del método que acabamos de presentar para la generación de las subimágenes puede entenderse con mayor claridad a través de la Figura 19. Como vemos en la figura, la extracción de los píxeles que ocupan la misma posición en las microimágenes equivale a considerar aquellos rayos luminosos que han atravesado el sistema, a través de una cierta región de la apertura de la lente de campo. El tamaño de esta sub-apertura de la LC viene dado por el cociente $\Delta x / |M_{g,g'}|$, siendo Δx el tamaño del píxel, y $M_{g,g'} = -g'/g$ el aumento lateral del sistema entre el plano de la lente de campo y el plano del sensor. Dicho de otra manera, combinar los píxeles que se encuentran en la misma posición relativa detrás de cada microlente es análogo a realizar una fotografía de la escena 3D desde el plano de la LC, con una lente equivalente cuyo tamaño queda definido por el tamaño de la sub-apertura. Así, las subimágenes obtenidas a partir de la imagen integral capturada mediante un sistema de imagen integral de campo lejano son equivalentes a las EIs registradas con un sistema de imagen integral de campo cercano, en el cual la MLA se hubiese situado sobre el plano de la LC. Podemos decir, por tanto, que existe una relación muy estrecha entre ambos tipos de sistemas, tal y como se verá en el capítulo 6.

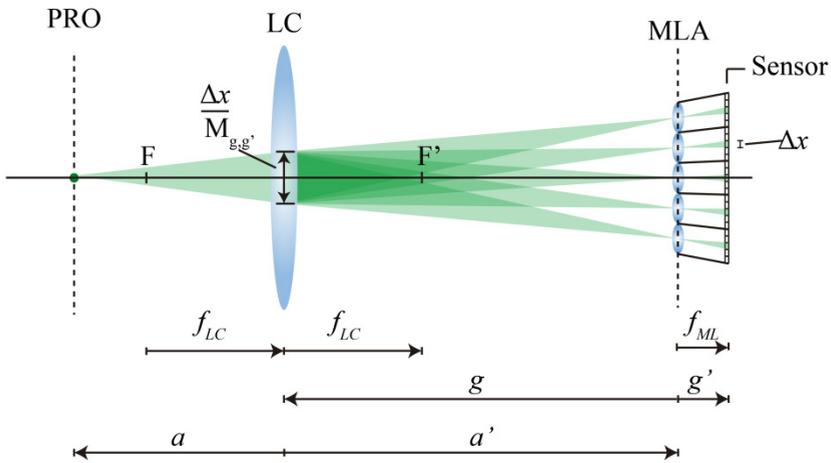


Figura 19. Sistema de imagen integral de campo lejano en el que se muestra cómo los rayos que atraviesan una cierta región de la LC, inciden sobre píxeles del sensor que ocupan la misma posición relativa detrás de cada microlente.

En la Figura 20 puede verse el proceso de extracción de los píxeles a partir del diagrama espacio-angular de la función plenóptica capturada por el sistema. Es importante destacar que, puesto que las subimágenes se generan extrayendo un único píxel por microimagen, éstas tendrán tantos píxeles como número de microlentes haya en la MLA. Además, dado el pequeño tamaño de la sub-apertura del sistema de captura equivalente, las subimágenes tendrán una alta profundidad de campo en comparación con las imágenes capturadas por una cámara convencional, cuyo objetivo tuviese un diámetro igual al diámetro de la apertura completa de la lente de campo del sistema de imagen integral.

Por último, cabe mencionar que el algoritmo de reconstrucción expuesto en la sección anterior para recuperar la información en profundidad de la escena 3D es también aplicable al conjunto de subimágenes generadas tal y como acabamos de presentar. Este será el procedimiento seguido a lo largo de esta Tesis, puesto que se obtienen mejores resultados ya que se evita la aparición de ciertos artefactos [64].

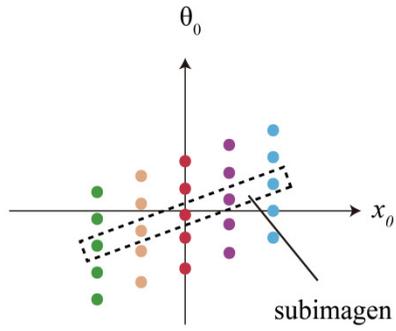


Figura 20. Distribución de radiancia en el plano de la MLA en un sistema de imagen integral de campo lejano y proceso de extracción de los píxeles que componen la subimagen central.

Capítulo 3

El microscopio de Imagen Integral

En este capítulo analizaremos las principales características de un microscopio de Imagen Integral, así como sus principales limitaciones en cuanto a resolución espacial se refiere.

3.1. Antecedentes

Durante los últimos años, se ha producido un creciente interés en la adquisición de la información tridimensional de objetos microscópicos debido a su repercusión en numerosas áreas de la Ciencia. En este sentido, se han desarrollado numerosas técnicas capaces de proporcionar dicha información. Por un lado, es posible obtener un conjunto de imágenes con seccionado óptico a partir de un barrido axial de la muestra, como en el caso de la microscopía por iluminación estructurada [68] o la microscopía *Light Sheet* [69],[70] o a través de un barrido 3D, tal y como ocurre en la microscopía confocal [71]. Estas técnicas presentan el inconveniente de que se requiere la captura de un elevado número de imágenes para registrar toda la información tridimensional de la muestra. En contraste, la microscopía holográfica digital permite obtener la información 3D de una muestra iluminada coherentemente, a partir de una única captura [45]. Los primeros intentos de visualizar la estructura tridimensional de objetos de tamaño reducido a partir de los conceptos de la imagen integral fueron llevados a cabo por Jang y Javidí [72]. En este trabajo, el empleo de una matriz de microlentes permitió a los autores realizar una reconstrucción óptica de una muestra microscópica tridimensional. Sin embargo, la imagen integral utilizada para la reconstrucción fue obtenida de manera indirecta, a través de

una pila de imágenes 2D de la muestra proporcionada por un microscopio confocal.

La primera vez que se empleó una matriz de microlentes con el fin de capturar múltiples perspectivas de una escena microscópica fue en 2006, con el trabajo desarrollado por M. Levoy et al. [42]. Puesto que la imagen integral capturada contiene toda la información espacial y angular de la escena tridimensional, la aplicación de diferentes algoritmos permitió llevar a cabo una reconstrucción de la muestra a diferentes profundidades, así como obtener las diferentes vistas de la misma. Este trabajo constituye, por tanto, un referente en el campo de la microscopía de imagen integral.

3.2. El microscopio convencional

Antes de exponer las características de los sistemas de microscopía integral, resulta conveniente analizar detalladamente algunos aspectos importantes acerca del proceso de formación de imágenes en un microscopio convencional.

Un microscopio es, por definición, un instrumento óptico capaz de proporcionar imágenes de objetos que, por su reducido tamaño, no es posible visualizar a *ojo desnudo*. Esta definición, sin embargo, resulta ser muy genérica pues incluye a una amplia variedad de dispositivos, desde microscopios muy sencillos constituidos por una única lente, hasta complejos sistemas compuestos por un gran número de elementos tanto ópticos como electrónicos. A excepción de los microscopios más simples en los que el aumento de la imagen se consigue a través de una única lente, el elemento común y, por otra parte, más importante en todo microscopio es sin duda el *objetivo*. El objetivo de microscopio determina, en esencia, la calidad de las imágenes obtenidas así como la resolución alcanzada por el sistema, tal y como veremos posteriormente.

A efectos prácticos, existen dos tipos de objetivos de microscopio. Por una parte se encuentran los *objetivos corregidos a distancia finita*. El objeto se sitúa a una cierta distancia de la lente frontal del objetivo, llamada distancia de trabajo (WD, del inglés *working distance*). La imagen de la

muestra se forma sobre un cierto plano conjugado con el plano de referencia objeto y situado a distancia finita del objetivo (ver Figura 21 (a)). El caso contrario lo constituyen los *objetivos corregidos al infinito*. Este tipo de objetivos están preparados para trabajar con objetos situados en su foco objeto, de manera que el haz de rayos paralelo que emerge del objetivo debe ser recolectado por un segundo elemento, la *lente de tubo* (LT), para finalmente proporcionar la imagen del objeto en el foco imagen de ésta (ver Figura 21 (b)).

Una característica común a ambos tipos de objetivos, es la presencia de un diafragma en el foco imagen del objetivo. Este diafragma actúa en ambos casos como diafragma de apertura (DA) del sistema, permitiendo definir uno de los parámetros más importantes de un objetivo de microscopio, su apertura numérica (NA, del inglés *numerical aperture*).

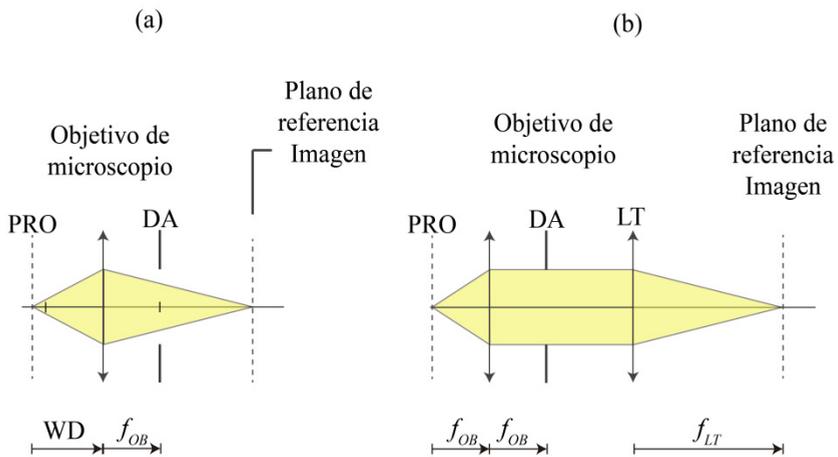


Figura 21. Esquema de funcionamiento de un microscopio trabajando en (a) óptica finita y (b) óptica infinita.

La apertura numérica de un objetivo es una medida de su capacidad de recolectar la luz, y puede obtenerse a través de la siguiente expresión

$$NA = n \sin(\alpha), \quad (3.1)$$

siendo n el índice de refracción del medio existente entre la muestra y el objetivo, y α el ángulo que define el valor de la semi-apertura (ver Figura 22). La apertura numérica, como veremos posteriormente, determinará en última instancia el poder de resolución de un objetivo.

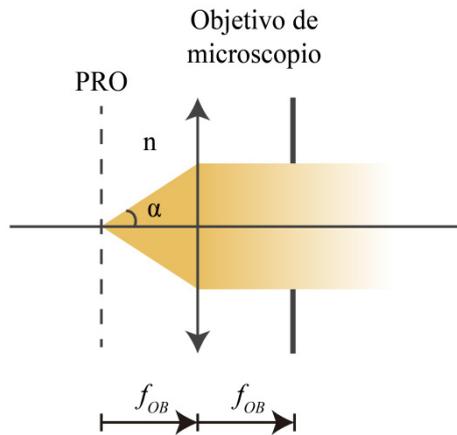


Figura 22. Definición de la apertura numérica NA de un objetivo de microscopio.

En el desarrollo de esta Tesis y de acuerdo con lo que acabamos de exponer, consideraremos que un microscopio está compuesto, fundamentalmente, por un objetivo corregido al infinito, una lente de tubo de distancia focal f_{LT} y un sensor de imagen tipo CCD o CMOS, dispuestos en la manera que se muestra en la Figura 23. A este microscopio le llamaremos microscopio convencional, para diferenciarlo del microscopio de imagen integral, objeto de este capítulo.

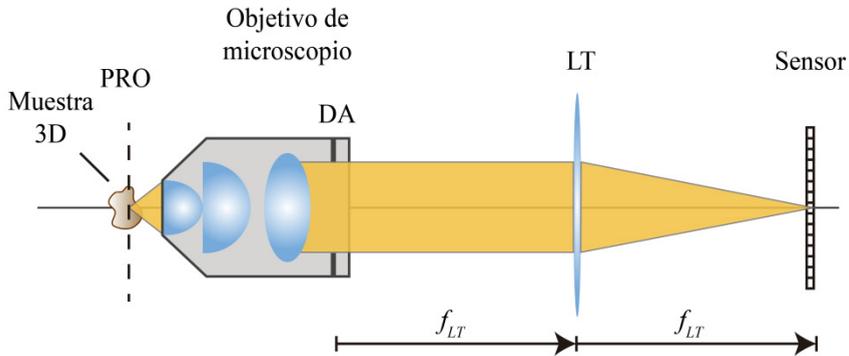


Figura 23. Esquema de un microscopio convencional, tal y como lo consideramos en el desarrollo de esta Tesis. Los principales elementos que componen un microscopio son el objetivo, la lente de tubo y el sensor de imagen.

3.2.1. Resolución lateral proporcionada por un microscopio convencional

Cuando consideramos un sistema de formación de imágenes macroscópicas, trabajamos habitualmente bajo el marco de la Óptica Geométrica de manera que el sistema puede ser representado haciendo uso únicamente de diagramas de rayos. De esta forma, la imagen geométrica obtenida será una réplica exacta del objeto, escalada de acuerdo con el aumento lateral del sistema. Así, la resolución proporcionada por dicho sistema, entendiendo ésta como la capacidad de distinguir los pequeños detalles de un objeto, está determinada típicamente por las características del sensor empleado en el registro de las imágenes o, más concretamente, por el tamaño de los píxeles contenidos en él. Sin embargo, en microscopía el tamaño de los objetos suele ser del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la iluminación, por lo que el proceso de formación de la imagen ya no puede ser analizado únicamente mediante razonamientos geométricos, pues los efectos de la difracción deben ser también tenidos en cuenta.

Supongamos una sección lateral de un cierto objeto tridimensional, situada en el plano focal objeto del objetivo, tal y como se muestra en la Figura 24 (a). Sea $u_0(x, y)$ la distribución de amplitud en dicho plano. De

acuerdo con la Teoría de la Difracción, es posible calcular la distribución de amplitud $u_1(x, y)$ en el plano imagen del microscopio, de manera que [75]

$$u_1(x, y) = \frac{1}{M} u_0 \left(\frac{x}{M}, \frac{y}{M} \right) \otimes_2 \tilde{p} \left(\frac{x}{\lambda f_{LT}}, \frac{y}{\lambda f_{LT}} \right), \quad (3.2)$$

donde el símbolo \otimes hace referencia a la operación convolución en 2D y \sim denota a la transformada de Fourier de la función. En la ecuación anterior, se ha denotado por M al aumento lateral proporcionado por el microscopio, aumento que puede obtenerse a partir del cociente de focales $M = f_{LT} / f_{OB}$,⁹ mientras que $p(x, y)$ representa a la función pupila del objetivo, esto es, la transmitancia del diafragma de apertura. Puesto que el diafragma del objetivo tiene forma circular y presenta simetría radial, resulta útil escribir la función pupila en coordenadas cilíndricas, de manera que $p(r) = circ(r / r_p)$, donde r_p denota al radio de la pupila. La transformada de Fourier de la función pupila nos proporcionará la respuesta impulsional del sistema. Dicha respuesta vendrá dada por la función *disco de Airy*, resultado que es bien conocido,

$$\tilde{p} \left(\frac{r}{\lambda f_{LT}} \right) = Disk \left(\frac{r}{\lambda f_{LT} / r_p} \right), \quad (3.3)$$

siendo \sim el símbolo que denota la transformada de Fourier 2D de la función. De acuerdo con las ecuaciones 3.2 y 3.3, es fácil ver que a consecuencia de considerar los efectos difractivos que tienen lugar en el sistema, cada uno de los puntos del objeto aparecerá como un disco de Airy en el plano imagen (ver Figura 24 (a)).

El tamaño del patrón de difracción se mide, usualmente, a través del radio del primer anillo del disco de Airy, medido desde el pico central hasta el

⁹ Nótese que estrictamente la expresión del aumento lateral debería contener un signo negativo ($M = -f_{LT} / f_{OB}$) puesto que la imagen proporcionada por un microscopio convencional es una imagen invertida.

primer cero de la función (ver Figura 24 (b)). El valor del radio puede obtenerse a partir la siguiente expresión

$$r'_0 = \frac{0.61\lambda f_{LT}}{r_p} \quad (3.4)$$

Esta última ecuación puede reescribirse en función de la apertura numérica en el espacio imagen definida como $NA' = n' \sin(\alpha')$, de manera que $r'_0 = 0.61\lambda / NA'$, donde se ha considerado que, en buena aproximación, $NA' \approx r_p / f_{LT}$.

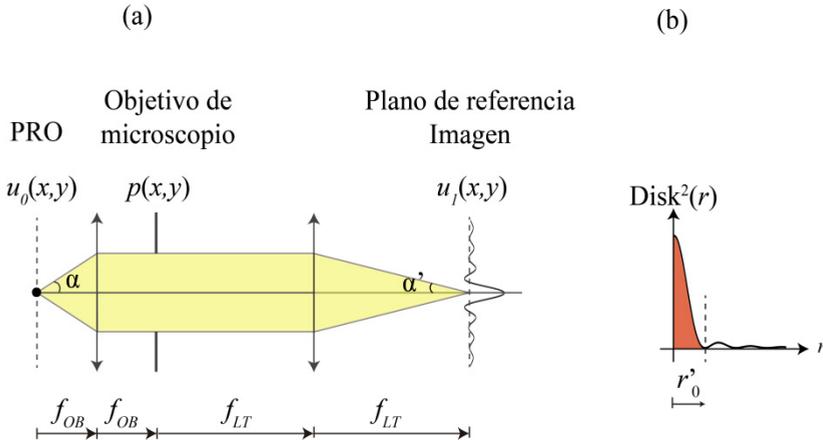


Figura 24. (a) Esquema representativo de los efectos difractivos en un microscopio convencional. (b) Respuesta impulsional de un microscopio convencional, representada a partir de la función disco de Airy. El tamaño del patrón de difracción viene determinado por el valor del radio del disco de Airy r'_0 .

El tamaño del disco de Airy permite establecer el límite de resolución del sistema, esto es, la mínima distancia entre dos puntos cuyas imágenes son aún distinguibles. De acuerdo con el criterio establecido por Lord Rayleigh, dos discos de Airy son distinguibles siempre que la distancia entre sus centros sea mayor que el radio del primer anillo. Esto permite definir el límite de resolución en el plano imagen como

$$\rho'_R = \frac{0.61\lambda}{NA'} . \quad (3.5)$$

No obstante, resulta más intuitivo el valor del límite de resolución evaluado en el espacio objeto,

$$\rho_R = \frac{0.61\lambda}{NA} . \quad (3.6)$$

Naturalmente, estos dos valores del límite de resolución están relacionados mediante el valor del aumento lateral del sistema, de manera que $\rho'_R = M \rho_R$.

Una forma alternativa de evaluar el límite de resolución es la debida a E. Abbe quien, a partir de la frecuencia de corte del microscopio, establece que

$$\rho_A = \frac{\lambda}{2NA} . \quad (3.7)$$

En cualquier caso, ya sea en términos del criterio de Rayleigh o de acuerdo con el de Abbe, cuanto mayor sea el valor de NA , menor será el tamaño del disco de Airy generado sobre el plano imagen y, en consecuencia, mayor será el poder de resolución. A modo de ejemplo, trabajando con luz monocromática de longitud de onda $\lambda = 550$ nm y un objetivo de aumento $50x$ y apertura numérica $NA = 0.95$ (que es el máximo valor que en la práctica puede obtenerse para objetivos en aire), la resolución del microscopio, calculada a partir de la ecuación 3.7, será de $\rho_A = 0.29$ μm en el espacio objeto, o de $\rho'_A = 14.5$ μm en el espacio imagen. Así, una buena elección del sensor empleado para registrar las imágenes debería tener en cuenta este dato, pues de acuerdo con los postulados de Nyquist se obtendría una situación óptima cuando el tamaño de cada uno de los píxeles fuese de $\Delta x = 7.25$ μm .¹⁰

¹⁰ Los postulados de Nyquist establecen que el muestreo se realiza de forma satisfactoria cuando el tamaño del píxel es igual a la mitad del tamaño del radio del disco de Airy.

3.3. Configuración de un microscopio de Imagen Integral

Un microscopio de Imagen Integral, al que por simplicidad llamaremos IMic (del inglés, *Integral Microscope*), puede ser considerado, en esencia, como un dispositivo óptico capaz de registrar tras una única captura la información tridimensional de una muestra microscópica bajo iluminación incoherente. Dicho dispositivo está compuesto en su forma más simple, por un objetivo de microscopio, una lente de tubo, una matriz de microlentes, y un sensor de imagen. De acuerdo con la Figura 25, vemos que los rayos luminosos que emergen del PRO de la muestra localizado en el plano focal objeto del objetivo son colimados por el conjunto de lentes del objetivo y focalizados por la lente de tubo sobre el plano focal imagen de ésta. A diferencia de un microscopio convencional en el cual el sensor se sitúa sobre este plano intermedio para realizar el registro de la imagen (véase Figura 23), el microscopio integral introduce sobre dicho plano una MLA.

Al igual que ocurre en los sistemas macroscópicos de imagen integral como los descritos en la sección 2.3, las microlentes recogen los rayos luminosos que inciden sobre ellas por su centro, haciéndolos incidir sobre píxeles diferentes del sensor, colocado ahora detrás de la matriz, a una distancia igual a la distancia focal de las microlentes f_{ML} . Mediante esta sencilla modificación de un microscopio convencional es posible registrar el mapa de radiancia de una muestra microscópica, capturando tanto su información espacial como angular.

Utilizar píxeles de mayor tamaño implicaría necesariamente un sub-muestreo y, en consecuencia, un detrimento de la resolución impuesta por la difracción del sistema. Por el contrario, el empleo de píxeles de menor tamaño al establecido por Nyquist no limita la resolución, pero tampoco produce una mejora en ésta.

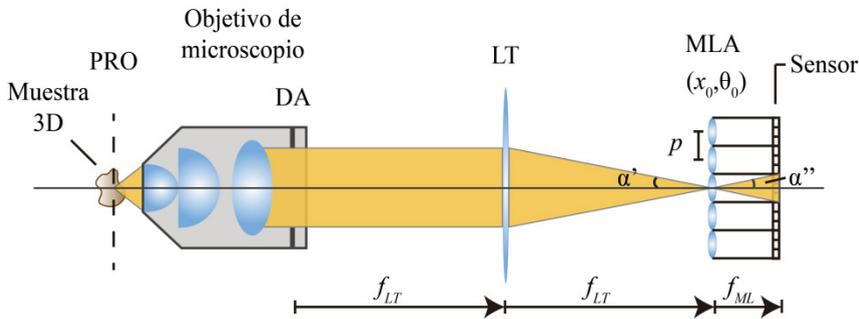


Figura 25. Esquema básico de un microscopio de imagen integral, compuesto fundamentalmente por un objetivo de microscopio, una lente de tubo, una matriz de microlentes y un sensor de imagen.

Nótese que en el esquema que acabamos de presentar, hemos considerado el caso más habitual en el cual se trabaja con objetivos corregidos al infinito. No obstante, es posible trabajar con óptica finita sustituyendo el sub-sistema formado por el objetivo y la lente de tubo mostrado en la Figura 25, por un único objetivo de microscopio. En este caso hay que tener en cuenta que, tal y como se comentó en la sección anterior, el PRO ya no se situará en el foco objeto del objetivo, sino a la distancia de trabajo, WD, del objetivo en cuestión.

Es importante mencionar que la configuración del microscopio integral que acabamos de presentar no es la única configuración posible. Otra posibilidad consiste en desplazar la matriz de microlentes de manera que éstas proporcionen sobre el sensor una imagen enfocada del plano de referencia objeto [77], en analogía con los llamados sistemas plenópticos 2.0 expuestos en el capítulo 2. No obstante, a lo largo de esta Tesis siempre que hagamos referencia a un microscopio de imagen integral nos estaremos refiriendo a aquellos construidos de acuerdo con el esquema de la Figura 25, por ser esta configuración la que permite obtener una mayor resolución angular y, por tanto, un mayor número de vistas de la muestra tridimensional.

3.3.1. Distribución de radiancia capturada por un microscopio de Imagen Integral

Haciendo uso de la configuración mostrada en la Figura 25, podemos decir que el objetivo de microscopio desempeña el mismo papel que la lente de campo en un sistema de imagen integral de campo lejano en cuanto a que traslada la escena tridimensional a las proximidades de la matriz de microlentes. Sin embargo, entre ambos sistemas existen algunas diferencias fundamentales que merece la pena tratar con un poco más de detalle.

Tal y como ya se ha comentado, los objetivos de microscopio incorporan un diafragma en su plano focal imagen que limita los rayos luminosos que atraviesan el sistema. Esto hace que la pupila de entrada se sitúe en el infinito, permitiendo considerar al sistema como un sistema telecéntrico en el espacio objeto. Si, además, el objetivo y la lente de tubo se encuentran dispuestos en configuración afocal tal y como puede verse en la Figura 25, entonces el sistema es telecéntrico también en el espacio imagen. De esta forma, los conos luminosos que emergen de diferentes puntos del objeto son simétricos y de anchura angular constante (ver Figura 26 (a)), tanto en el espacio objeto como en el espacio imagen. Así, la distribución de radiancia en el plano de la MLA (x_0, θ_0) puede representarse de acuerdo al diagrama espacio-angular de la Figura 26 (b).

Nótese que en un microscopio convencional, el hecho de que el sistema sea telecéntrico en el espacio objeto tiene un inconveniente, y es que desplazar la muestra lateralmente no produce ningún tipo de paralaje [42]. Esto, sin embargo, no representa ningún problema cuando tratamos de registrar la función plenóptica de una muestra tridimensional ya que, al añadir la matriz de microlentes en el plano imagen del microscopio convencional conseguimos preservar la información direccional.

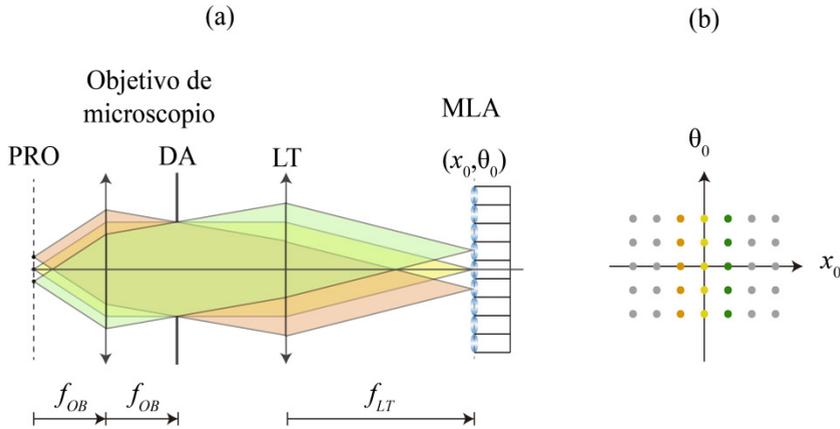


Figura 26. (a) Diagrama de rayos en un sistema telecéntrico en el espacio objeto y en el espacio imagen. (b) Representación en el diagrama espacio-angular de la función plenótica en el plano de las microlentes en un microscopio de Imagen Integral.

Por otra parte, puesto que los elementos que componen un IMic se disponen en configuración afocal, el aumento lateral proporcionado por el sistema es constante independientemente del plano en el que se sitúe el objeto, siendo este aumento $M = f_{LT} / f_{OB}$, tal y como se comentó en la sección 3.2.1. En consecuencia, las vistas obtenidas con un microscopio de Imagen Integral son vistas ortográficas.

3.4. Relación entre la apertura numérica del objetivo y el tamaño de las microlentes en un microscopio de Imagen Integral

Igual que ocurre en los sistemas de imagen integral de campo lejano, en un microscopio de imagen integral es necesario escoger cuidadosamente las características de las microlentes en relación al tamaño de la pupila del objetivo con el fin de obtener sobre el sensor microimágenes tangentes entre sí, es decir, sin que existan huecos pero tampoco un solapamiento entre ellas (ver Figura 12).

De acuerdo con la Figura 25, es fácil ver que esto último implica que los ángulos α' y α'' sean iguales o, dicho de otra manera, que la apertura numérica del objetivo en el espacio imagen $NA' = NA/M$ sea igual a la apertura numérica NA_{ML} de las microlentes. De esta forma, la ecuación 2.12 puede reescribirse como

$$\frac{NA}{M} = \frac{p}{2f_{ML}}. \quad (3.8)$$

El cumplimiento de la ecuación anterior asegura, por tanto, un correcto aprovechamiento de los píxeles que conforman el sensor.

3.5. Resolución lateral en un microscopio de Imagen Integral

Tal y como se vio en la sección 2.3.2.3, en los sistemas de imagen integral de campo lejano la resolución lateral viene determinada fundamentalmente por la frecuencia de muestreo de la información espacial, es decir, por el tamaño de las microlentes empleadas en el proceso de captura, ya que el plano de referencia objeto y el plano de las microlentes son planos conjugados¹¹. Aunque siempre va a producirse una pérdida de resolución lateral en favor de la resolución angular, es posible encontrar un compromiso entre ambas variables de manera que los resultados obtenidos sean satisfactorios.

En un IMic, lo anterior es igualmente cierto puesto que la pérdida de resolución espacial es inherente a todo sistema de imagen integral. De esta forma, el límite de resolución en el espacio objeto en un microscopio integral queda impuesto por el valor del período de las microlentes, así como del aumento del objetivo de microscopio. Dado que para que dos puntos sean resueltos sus imágenes deben formarse sobre dos microlentes no contiguas de la matriz, este límite de resolución puede expresarse como:

¹¹ El plano de referencia objeto y el plano de las microlentes son planos conjugados cuando trabajamos con un sistema de imagen integral de campo lejano, en configuración 1.0.

$$\rho_{vistas} = \frac{2p}{M}. \quad (3.9)$$

Este límite de resolución hace referencia, sin embargo, a la resolución obtenida en el proceso de captura, la cual no debe confundirse con la resolución lateral obtenida como consecuencia del proceso de reconstrucción. En este caso y dado que la reconstrucción se lleva a cabo a través de un entrelazado de los píxeles que componen las distintas subimágenes (ver capítulo 2), es posible demostrar que la resolución espacial obtenida en las reconstrucciones estará contenida en un cierto intervalo [78], de manera que:

$$\rho_{rec} \in \left[\frac{p}{M}, \frac{2p}{M} \right]. \quad (3.10)$$

Puesto que el límite de resolución es directamente proporcional al tamaño de las microlentes, parece justificado trabajar con microlentes lo más pequeñas posible, ya que el tamaño de las mismas define el tamaño del píxel equivalente de las subimágenes o vistas ortográficas en el espacio objeto y por tanto, el intervalo de muestreo. Sin embargo, en microscopía la difracción juega un papel fundamental dado el pequeño tamaño de los objetos involucrados, tal y como se puso de manifiesto en la sección 3.2. De esta forma, si las microlentes no son lo suficientemente grandes en comparación con el patrón de difracción generado por el microscopio, no es posible asumir una Teoría Parageométrica y considerar, en buena aproximación, que el modelo de rayos propuesto en el capítulo 2 es igualmente válido para describir el microscopio de Imagen Integral. Esta condición puede expresarse en la forma $p = \mu r'_0$, siendo μ un número real. Aunque no existe un consenso acerca de cuál debe ser este tamaño mínimo, experimentalmente hemos comprobado que la utilización de microlentes cuyo período es como mínimo cuatro veces el tamaño del disco de Airy ($\mu \geq 4$) proporciona resultados aceptables en términos de su resolución. Vemos pues que, aún en el mejor de los casos, la resolución espacial obtenida con un microscopio de Imagen Integral dista mucho de la

resolución proporcionada por un microscopio convencional, incluso tras la aplicación de sofisticados algoritmos de desconvolución [76].

3.6. Comprobación experimental de la resolución lateral obtenida con un microscopio de Imagen Integral

Para poner de manifiesto esta pérdida en la resolución espacial de las imágenes reconstruidas a partir de la imagen integral obtenida con un IMic, en comparación con las imágenes proporcionadas por un microscopio convencional, se implementó en el laboratorio un microscopio de Imagen Integral de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 25.

Para ello, se utilizó un objetivo de aumento $20\times$ y apertura numérica $NA = 0.4$ (Olympus), y una lente de tubo constituida por un doblete acromático de distancia focal $f_{LT} = 200$ mm. La matriz de microlentes consta de una cara plana y la otra moldeada con microsuperficies esféricas de período $p = 110$ μm y apertura numérica $NA_{ML} = 0.01$ (MLA #12-1192-106-000, fabricadas por SUSS MicroOptics). Para satisfacer la ecuación 3.8 y evitar así el solapamiento de las microimágenes, se introdujo un diafragma iris adicional en el plano de la pupila del objetivo consiguiendo una apertura numérica efectiva de $NA_{ef} = 0.2$. Por otra parte, para registrar las microimágenes, en lugar de colocar el sensor detrás de las microlentes a una distancia igual a su distancia focal $f_{ML} = 5.5$ mm, se utilizó una cámara digital Canon 450D, con un sensor CMOS de 4272×2848 píxeles de 5.2 μm de tamaño, acoplado a un objetivo macro 1:1.

Con este dispositivo, se procedió a registrar la imagen integral de un test USAF 1951 de alta resolución en negativo¹² situado a una cierta distancia del plano de referencia objeto del microscopio. En la Figura 27 puede verse una fotografía del montaje utilizado para llevar a cabo el experimento.

¹² En un test USAF en negativo, los grupos del test son transparentes y se encuentran sobre una lámina de cristal recubierta de cromo.

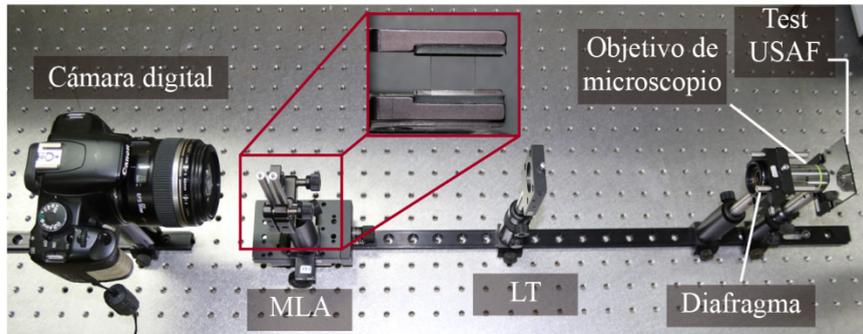


Figura 27. Montaje experimental utilizado para implementar un microscopio de imagen integral.

En la Figura 28 (a) se muestra la imagen integral obtenida con el IMic. Dicha imagen integral está compuesta por 113×113 microimágenes de 17×17 píxeles cada una. Para evitar en las reconstrucciones la aparición de artefactos en forma de patrones periódicos, se llevó a cabo una transposición de las microimágenes, obteniendo así una nueva imagen compuesta por 17×17 subimágenes (o vistas ortográficas), con 113×113 píxeles cada una (ver Figura 28 (b)). A esta imagen se le aplicó el algoritmo de reconstrucción descrito en la sección 2.4.1. Para obtener un mayor número de planos de reconstrucción, las subimágenes fueron redimensionadas hasta un tamaño de 678×678 píxeles cada una, mediante una interpolación por el vecino más cercano, de manera que la resolución del sistema no se ve afectada por este reescalado. El algoritmo fue implementado en Matlab[®], obteniéndose un tiempo de cálculo del orden de 1 segundo para 14 planos de reconstrucción.

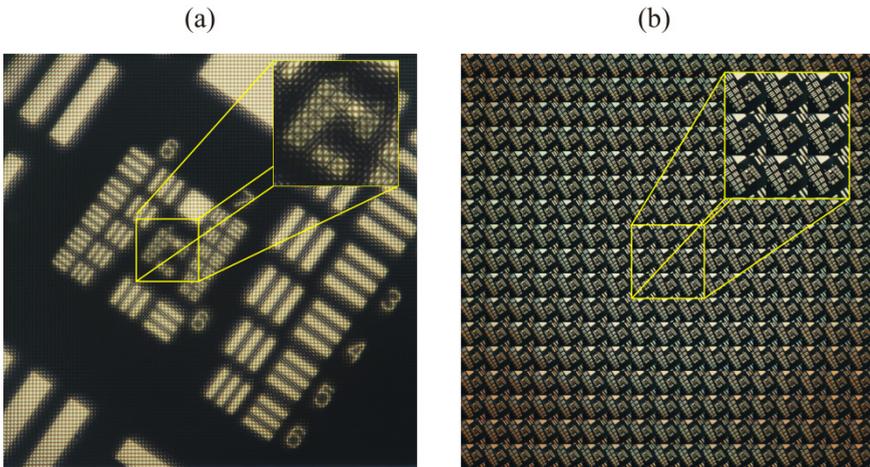


Figura 28. (a) Imagen Integral capturada con el IMic implementado en el laboratorio. La imagen consta de 113×113 microimágenes, de 17×17 píxeles cada una. (b) Conjunto de las 17×17 subimágenes calculadas a partir de (a).

De acuerdo con la ecuación 3.10, el límite de resolución de las imágenes reconstruidas debe estar contenido dentro del intervalo $\rho(\mu m) \in [5.5, 11.0]$. A partir de la Figura 29 (a) es fácil comprobar que el elemento que determina la resolución en este caso es el Elemento 4 del Grupo 7 (elemento contenido bajo el cuadro blanco en la figura), el cual corresponde a una resolución espacial de $\rho = 5.5 \mu m$, por lo que podemos afirmar que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites teóricos (ver Anexo 2).

Finalmente, se obtuvo la imagen del test de resolución con un microscopio convencional, eliminando del sistema la matriz de microlentes y colocando en su lugar la cámara fotográfica empleada para la captura. La imagen obtenida puede verse en la Figura 29 (b). Puesto que es posible observar con claridad todos y cada uno de los grupos de líneas presentes en el test, la resolución en este caso debemos obtenerla a partir de la expresión teórica dada por la ecuación 3.7. Así, considerando una longitud de onda de $\lambda = 550 \text{ nm}$, la resolución obtenida con un microscopio convencional de apertura numérica efectiva $NA_{ef} = 0.2$ es de $\rho_{conv} = 1.4 \mu m$.

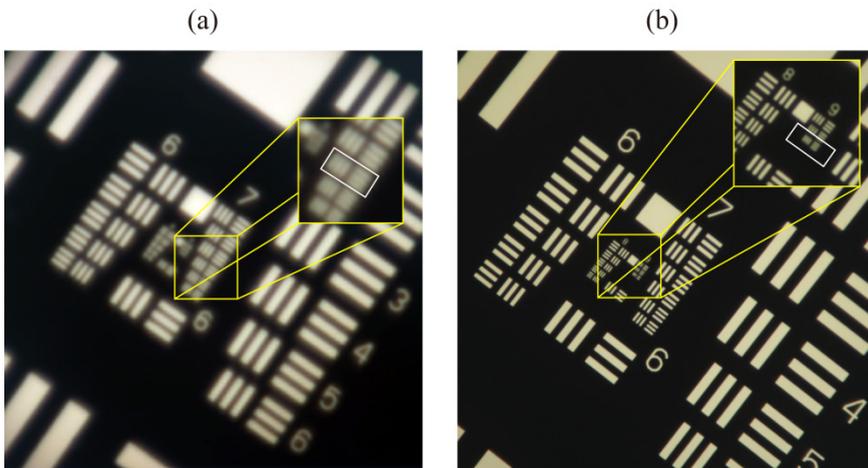


Figura 29. (a) Reconstrucción del test USAF a partir de la imagen integral capturada con el IMic. (b) Imagen proporcionada por un microscopio convencional.

Estos resultados ponen de manifiesto, por tanto, el hecho de que aunque la resolución obtenida con un IMic se encuentra dentro de los límites teóricos, existe una pérdida de resolución espacial en comparación con la resolución proporcionada por un microscopio convencional. A partir de los valores numéricos obtenidos, podemos afirmar que esta última es unas cuatro veces mejor que la resolución proporcionada por el sistema de imagen integral. Esta disminución en la resolución espacial es, sin duda, la principal limitación de los sistemas de microscopía integral en comparación con otras técnicas de microscopía 3D.

Capítulo 4

Aumento de la resolución espacial de un microscopio de Imagen Integral mediante un proceso de doble captura

Tal y como se ha puesto de manifiesto en el capítulo anterior, el principal inconveniente de los sistemas de microscopía integral es la pérdida de resolución espacial de las imágenes reconstruidas en comparación con la resolución proporcionada por un microscopio convencional.

Puesto que, en esencia, la resolución espacial se encuentra limitada por el tamaño de las microlentes contenidas en la matriz empleada en el sistema de captura, la solución trivial para mejorar la resolución sería reducir el tamaño de las mismas. Sin embargo, esta solución no es satisfactoria ya que esto implicaría aumentar los efectos difractivos y, en consecuencia, alejarse del comportamiento parageométrico. Parece necesario pues, plantear un método alternativo que permita mejorar la resolución espacial. Con este propósito, en [77] se describe un método para incrementar la resolución, basado en una matriz de microlentes móvil. De esta forma, es posible registrar un conjunto de imágenes integrales que, combinadas convenientemente, permiten aumentar la frecuencia de muestreo del objeto y disminuir entonces de forma efectiva el tamaño de las microlentes sin incrementar los efectos difractivos. Sin embargo, el sistema que proponen los autores de este trabajo está basado en una configuración 2.0, por lo que el incremento del muestreo no se proyecta directamente en el dominio espacial, dando lugar a que el beneficio obtenido en la resolución lateral no sea tan alto como cabría esperar.

Otro intento de mejorar la resolución de un IMic lo encontramos en [79], donde los autores llevan a cabo una interpolación sobre las microimágenes capturadas. Este procedimiento, sin embargo, no aumenta efectivamente la resolución de las imágenes puesto que ésta queda determinada por la información capturada por el sistema original.

En este capítulo presentaremos un método de mejora de la resolución espacial obtenida con un microscopio de Imagen Integral [80]. El método consiste en la captura secuencial de dos mapas de radiancia, adecuadamente desplazados, y su posterior entrelazado para crear un nuevo mapa de radiancia sintético en el cual el número de puntos de muestreo sea el doble que en el caso habitual. De esta forma, veremos que es posible incrementar la resolución espacial en un factor $\sqrt{2}$.

4.1. Aumento de los puntos de muestreo en un microscopio de Imagen Integral

Consideremos un microscopio de Imagen Integral como el representado en la Figura 30.

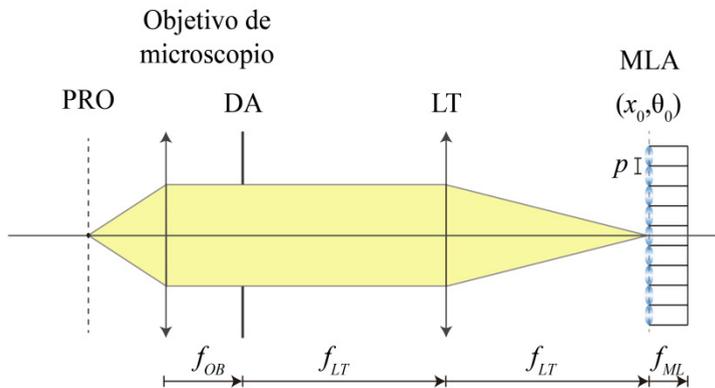


Figura 30. Esquema de un microscopio de Imagen Integral.

Dada una matriz de microlentes de período p , el mapa de radiancia $L(x_{0,1}, \theta_{0,1})$ en el plano de la matriz puede representarse a través del diagrama

que se muestra en la Figura 31 (a), tal y como se vio en el capítulo anterior. Supóngase que se consigue, de alguna manera, desplazar el mapa de radiancia en la dirección horizontal una cierta cantidad d_x , de manera que el nuevo mapa de radiancia sea $L(x_{0,2}, \theta_{0,2})$. Las coordenadas espaciales y angulares de la nueva función plenóptica estarán relacionadas con las coordenadas de la función plenóptica de la manera siguiente

$$\begin{aligned} x_{0,2} &= x_{0,1} + d_x \\ \theta_{0,2} &= \theta_{0,1} \end{aligned} \quad (4.1)$$

Para obtener puntos de muestreo equidistantes entre sí, se considerarán siempre desplazamientos que sean fracción del período p , en la forma $d_x = p / m_x$, siendo m_x un número entero. De esta forma, es posible construir un nuevo mapa de radiancia sintético $L_{sim}(x_0, \theta_0)$ obtenido directamente a partir de la unión de las radiancias individuales

$$L_{sim}(x_0, \theta_0) = L(x_{0,1}, \theta_{0,1}) \cup \dots \cup L(x_{0,m_x}, \theta_{0,m_x}). \quad (4.2)$$

En la Figura 31 (c) puede verse representado el mapa de radiancia sintético $L_{sim}(x_0, \theta_0)$ para el caso particular en el que el desplazamiento corresponde a la mitad del período de las microlentes, es decir $d_x = p / 2$ (Figura 31 (b)). La imagen integral sintética asociada a la función plenóptica obtenida mediante este procedimiento es equivalente a la imagen integral que se habría obtenido directamente si en el proceso de captura se hubiesen empleado microlentes cuyo período fuese la mitad del período de las microlentes originales, pero del mismo tamaño, lo que garantiza que tanto los efectos difractivos como el número de píxeles por microimagen queden inalterados. De esta forma, de acuerdo con la ecuación 3.9, la resolución espacial de las imágenes reconstruidas en el sistema de imagen integral será mayor.

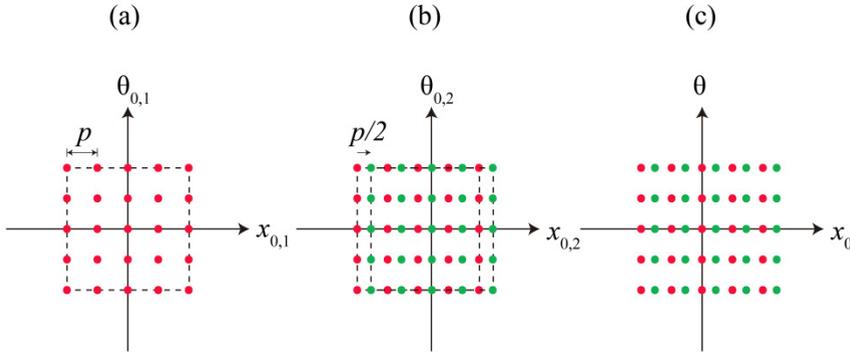


Figura 31. Composición del mapa de radiancia sintético para el caso particular en el cual el desplazamiento es igual a la mitad del período de las microlentes, $d_x = p/2$.

Aunque todo lo expuesto hasta ahora hace referencia al caso en el que la función plenóptica es una función bidimensional, la generalización a 4D es inmediata, pues basta con tener en cuenta el desplazamiento en las dos direcciones espaciales x e y .

Debido a que el período de las microlentes define el intervalo de muestreo en el espacio objeto, es posible aumentar progresivamente la frecuencia de muestreo a voluntad, mediante valores del desplazamiento cada vez más pequeños. Sin embargo, a medida que disminuye el desplazamiento, aumenta el número de capturas de las correspondientes imágenes integrales individuales. Hay que tener en cuenta que trabajar con muchas imágenes integrales supone aumentar, no sólo el tiempo de adquisición de las mismas, sino también el tiempo de cálculo necesario para combinar dichas imágenes. Por este motivo, se propone incrementar la resolución realizando tan sólo dos capturas. Para ello, se considerará un desplazamiento igual a la mitad del período de las microlentes en las dos direcciones espaciales, de manera que $\mathbf{d} = (d_x, d_y) = (p/2, p/2)$ o lo que es lo mismo, $d = \sqrt{2}p/2$ a lo largo de la diagonal. En la Figura 32 puede verse un esquema de cómo se produce el desplazamiento en las coordenadas espaciales del mapa de radiancia.

Nótese que la imagen integral sintética obtenida mediante este procedimiento, presentará una serie de microimágenes vacías (representadas

mediante puntos negros en la Figura 32 (c)), que se corresponden con los puntos del objeto que no han sido muestreados. No obstante, esto no representa ningún inconveniente a la hora de aplicar los algoritmos de reconstrucción y recuperar así la información 3D del objeto, tal y como se verá posteriormente.

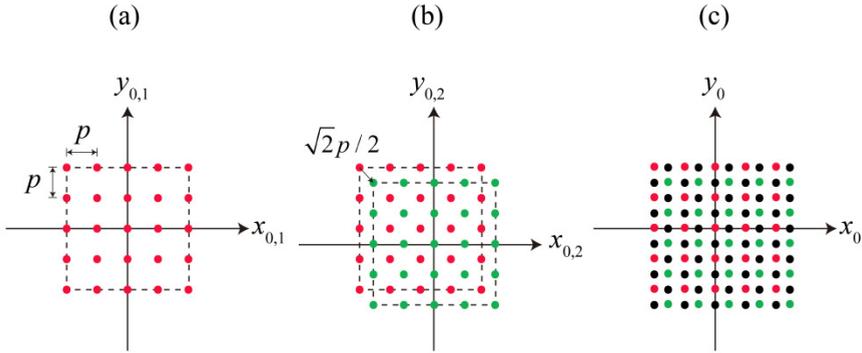


Figura 32. Esquema del proceso de creación de un mapa de radiancia sintético, en el caso particular para el cual el desplazamiento es igual a la mitad del período de las microlentes, en ambas direcciones espaciales, $d_x = d_y = p/2$.

4.2. Multiplexado temporal como método propuesto para incrementar los puntos de muestreo en un microscopio integral

Para desplazar el mapa de radiancia de acuerdo a lo explicado en la sección anterior y obtener así un mejor muestreo espacial del objeto, proponemos la utilización de una lámina plano-paralela de índice de refracción n y grosor ℓ , insertada en una posición arbitraria entre la lente de tubo y la matriz de microlentes de un microscopio integral (ver Figura 33).

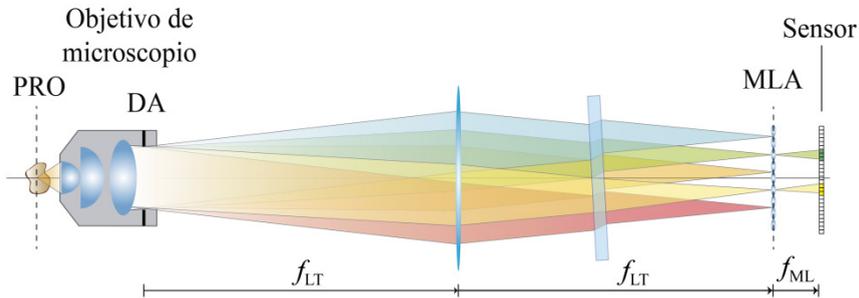


Figura 33. Inserción de una lámina plano paralela en un IMic. La lámina se sitúa en una posición arbitraria entre la lente de tubo y la MLA.

Debido a la doble refracción que ocurre en el interior de la lámina, un rayo que incide con un cierto ángulo saldrá de ella manteniendo su inclinación, pero desplazado lateralmente con respecto al rayo incidente (ver Figura 34 (a)). Si además la lámina plano-paralela es rotada un cierto ángulo γ con respecto al eje transversal al eje óptico (Figura 34(b)), mediante un cálculo sencillo y bajo aproximación paraxial, puede demostrarse que el rayo luminoso sufre una cierta desviación d en su coordenada espacial dada por la expresión (ver Anexo 1)

$$d = \ell \gamma \frac{n-1}{n}. \quad (4.3)$$

De esta forma, controlando la inclinación de la lámina podemos desplazar el mapa de radiancia a voluntad, obteniendo así un mejor muestreo del objeto, tal y como se puso de manifiesto en la sección anterior.

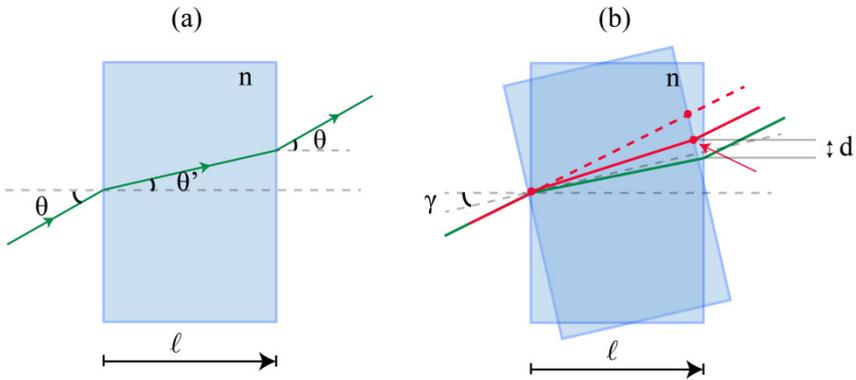


Figura 34. Efecto de insertar una lámina plano-paralela. (a) Los rayos que inciden sobre la lámina con una cierta inclinación mantienen su dirección a la salida de la misma, pero sufren un cierto desplazamiento lateral. (b) El desplazamiento de los rayos es función del ángulo γ de rotación de la lámina con respecto al eje óptico.

Nótese que el simple hecho de introducir una lámina de vidrio en el sistema, tiene como consecuencia un desplazamiento axial del plano imagen (véase de nuevo el Anexo 1). Este desplazamiento $\Delta z'$ puede expresarse como

$$\Delta z' = \ell \frac{n-1}{n}, \quad (4.4)$$

siendo $\Delta z = \Delta z' / M^2$ el correspondiente desplazamiento en el espacio objeto. Puesto que en un IMic las microlentes se sitúan en una posición fija, a una distancia de la lente de tubo igual a su distancia focal f_{LT} , la ecuación anterior implica que el plano de referencia objeto ha de determinarse de manera cuidadosa con el fin de obtener sobre el plano de la MLA una imagen perfectamente enfocada del mismo. No obstante, el desplazamiento Δz suele ser inferior a la profundidad de campo proporcionada por los distintos objetivos de microscopio, por lo que su efecto no va a ser significativo¹³.

¹³ A modo de ejemplo, para una lámina plano paralela de 1 mm de grosor e índice de refracción 1.5 y considerando un objetivo de microscopio de aumento 20x y apertura

Aunque la idea de combinar diferentes mapas de radiancia ha sido aplicada con anterioridad tanto en sistemas macroscópicos [59] como microscópicos [77], la manera que proponemos aquí de obtener la información presenta una serie de ventajas. La principal ventaja de este diseño es que el desplazamiento en el mapa de radiancia se consigue sin necesidad de mover ninguno de los elementos del microscopio integral. De esta forma se evita introducir vibraciones innecesarias que podrían desestabilizar el sistema y deteriorar la calidad final de las imágenes capturadas.

4.3. Resultados experimentales

Para demostrar los conceptos expuestos en la sección anterior, se realizó un experimento de microscopía integral en el cual se insertó una lámina plano-paralela de grosor $\ell = 1.0$ mm e índice de refracción $n = 1.5$, montada sobre una plataforma manual con dos goniómetros, uno para cada dirección, y con una precisión de 0.1° (ver Figura 35).

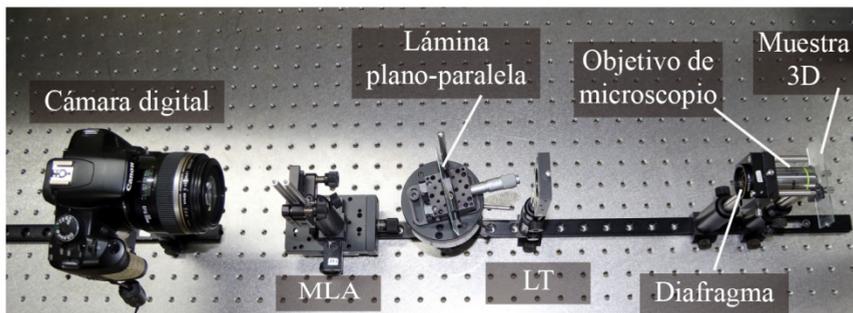


Figura 35. Montaje experimental empleado para aumentar los puntos de muestreo en un IMic.

Se utilizó el mismo microscopio (objetivo $20\times$, $NA = 0.4$ y lente de tubo con $f_{LT} = 200$ mm) y las mismas microlentes ($p = 110$ μm , $NA_{ML} = 0.01$)

numérica $NA = 0.4$, el desplazamiento axial Δz es de 0.83 μm , frente a una profundidad de campo de 3.4 μm proporcionada por el objetivo.

que en el experimento descrito en el capítulo anterior. Con estas características y de acuerdo con la ecuación 4.3, el ángulo de rotación necesario de la lámina plano paralela para conseguir un desplazamiento del mapa de radiancia de $\sqrt{2}p/2$ es de $\gamma=13.4^\circ$.

El primer objeto empleado en el experimento fue un test USAF 1951 de alta resolución en negativo. Con esta configuración, se obtuvieron dos imágenes integrales de 113x113 microimágenes. Combinando ambas imágenes según el procedimiento descrito en la sección anterior, obtuvimos una imagen integral sintética de 226x226 microimágenes. En la siguiente figura podemos ver un recorte de las imágenes originales (Figura 36 (a) y Figura 36 (b)), representadas con colores diferentes para mayor claridad. La Figura 36 (c) muestra el resultado de entrelazar ambas imágenes de acuerdo a la ecuación 4.2. Nótese la estructura de *tablero de ajedrez* en la composición debido al desplazamiento relativo de las imágenes individuales a lo largo de la diagonal. Tal y como veremos a continuación, estas microimágenes vacías no van a repercutir en la calidad de las reconstrucciones si evitamos convenientemente el plano de las microlentes como plano de reconstrucción. Para ello, el Test USAF se situó en una posición axial ligeramente desplazada con respecto al plano conjugado con la MLA.

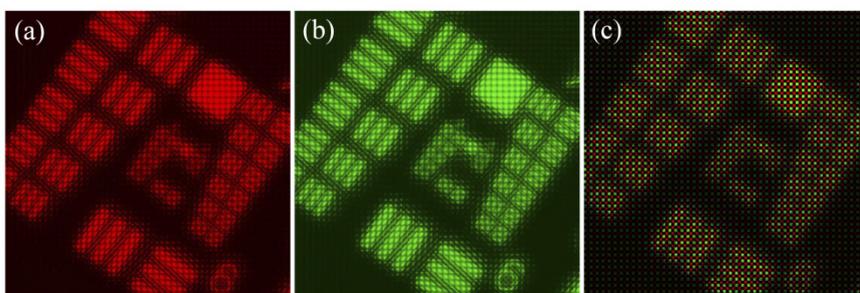


Figura 36. (a) Recorte de la Imagen Integral capturada con un IMic. (b) Imagen Integral capturada tras el correspondiente desplazamiento del mapa de radiancia. (c) Imagen Integral sintética generada mediante el entrelazado de (a) y (b).

En la figura siguiente se muestra la reconstrucción del objeto test obtenida tras aplicar la correspondiente transposición y algoritmo de reconstrucción a la imagen integral de la Figura 36 (a), así como a la imagen integral sintética mostrada en Figura 36 (c).

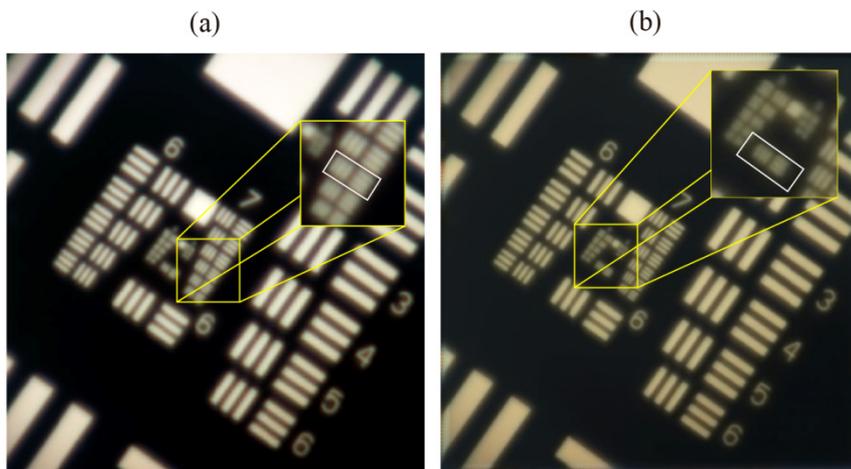


Figura 37. Reconstrucción del test USAF a partir de la imagen integral correspondiente a (a) una única captura (Figura 36 (a)) y (b) un proceso de doble captura (Figura 36 (c)).

De acuerdo con la figura y al Anexo 2, la resolución obtenida en las reconstrucciones aparece resumida en la siguiente tabla:

Tipo de captura	$\rho(\mu m)$
Reconstrucción con 1 captura	5.5
Reconstrucción con multiplexado temporal	3.9

Tabla 1. Valores obtenidos para la resolución espacial de la reconstrucción a partir de la imagen integral obtenida tras una única captura y a partir de la imagen integral sintética.

Vemos que la resolución de las reconstrucciones obtenidas mediante el método propuesto de multiplexado temporal se ve incrementada un factor $\sqrt{2}$ con respecto al caso en el cual la captura es única.

Por otra parte, cabe recordar que la resolución proporcionada por un microscopio convencional viene dada por la ecuación 3.7. Para una longitud de onda de $\lambda = 550$ nm y dadas las características del objetivo utilizado en el experimento, esta resolución resulta ser de $\rho_{conv} = 1.4$ μm . Aunque los valores del límite de resolución mostrados en la Tabla 1 son superiores al límite de resolución proporcionado por el microscopio convencional, podemos afirmar que el método de multiplexación temporal nos permite alcanzar resoluciones de aproximadamente $2/5$ la resolución del microscopio convencional.

Una vez demostrado que el método propuesto aumenta, efectivamente la resolución espacial lateral de las reconstrucciones, vamos a mostrar los resultados obtenidos al aplicar el método del multiplexado temporal para la captura y reconstrucción de un talo de algas marinas (*Seaweed tallus*). Al igual que en el caso anterior, se obtuvieron dos imágenes integrales compuestas por 113×113 microimágenes, con 17×17 píxeles cada una. En la Figura 38 (a) puede verse una de las dos capturas, mientras que en la Figura 38 (b) mostramos la imagen integral sintética obtenida como resultado de la interpolación física de ambos mapas de radiancia. En la Figura 38 (c) se muestra el conjunto de las 17×17 subimágenes obtenidas a partir de la correspondiente trasposición de la imagen integral sintética.

Nótese que como consecuencia de la trasposición, la estructura en forma de tablero de ajedrez se ha trasladado ahora a las vistas ortográficas, de manera que éstas poseen información únicamente en la mitad de sus píxeles. Para poder realizar una correcta visualización de las vistas, se procedió a realizar una interpolación bilineal de las mismas.

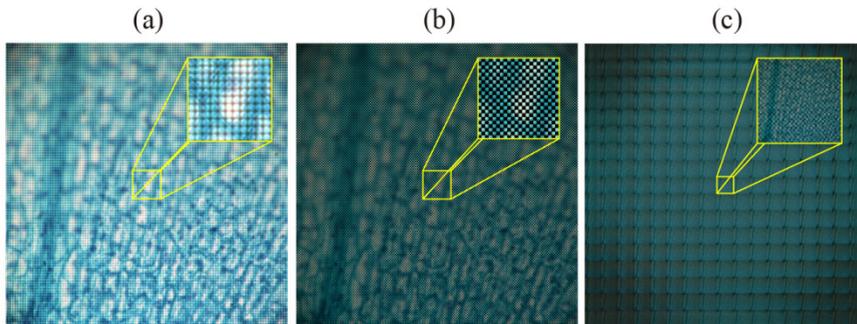


Figura 38. (a) Imagen integral de un talo de algas marinas obtenida tras una primera captura. (b) Imagen integral sintética generada a partir de la combinación de dos capturas simples. (c) Vistas ortográficas de la muestra obtenidas por trasposición de (b).

En la figura siguiente, puede verse cómo la aplicación del método propuesto proporciona vistas ortográficas de la muestra microscópica con una mayor resolución espacial (Figura 39 (c)) que las obtenidas mediante un proceso de captura simple (Figura 39 (a)). Finalmente, se llevó a cabo la reconstrucción de la escena en profundidad (Figura 39 (b) y Figura 39 (d)). De nuevo en este caso puede comprobarse cualitativamente como el microscopio de imagen integral con multiplexado temporal proporciona mejores resultados.

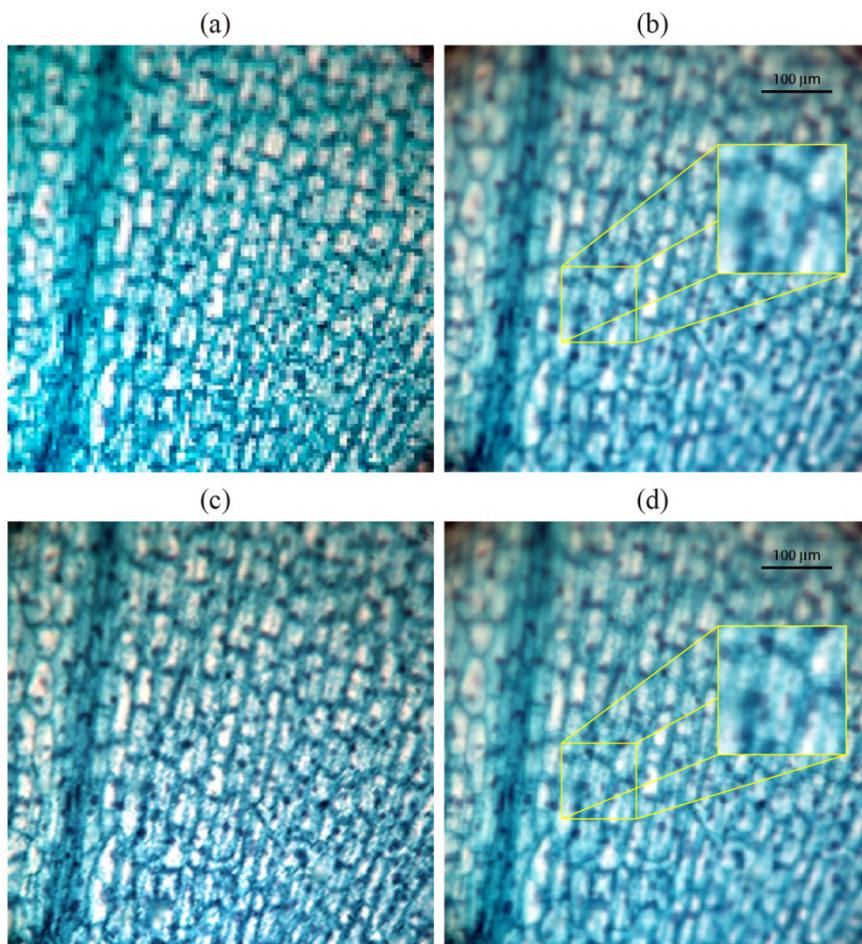


Figura 39. Vistas ortográficas de la muestra microscópica y reconstrucción en profundidad obtenidas a partir de una única captura (a) y (b), y tras un proceso de doble captura (c) y (d), respectivamente.

Capítulo 5

Aumento de la profundidad de campo en un microscopio de Imagen Integral

En este capítulo proponemos un método para incrementar la profundidad de campo de las reconstrucciones obtenidas a partir de la captura proporcionada por un microscopio de imagen integral. El método se basa en la capacidad de una lente líquida de distancia focal variable para, adecuadamente insertada en el sistema, cambiar la posición axial del plano de referencia objeto.

5.1. Profundidad de campo en un microscopio de Imagen Integral

En los capítulos previos se ha podido constatar cómo la captura de imágenes integrales permite obtener, a través del correspondiente procesado digital, diferentes perspectivas de un objeto 3D así como también su correspondiente reconstrucción en profundidad. Aunque la mayor limitación presente en ambos tipos de reconstrucciones es su escasa resolución transversal, existe también una cierta restricción en cuanto a la profundidad de campo se refiere [81]. Tal y como se vio en el capítulo 2, es necesario que la escena de interés se sitúe dentro de la profundidad de campo del sistema para que ésta pueda ser reconstruida adecuadamente. Dicho de otra forma, la información relativa a aquellas regiones de la escena 3D situadas fuera de la profundidad de campo del sistema de captura aparecerá desenfocada, tanto en la reconstrucción en profundidad como en las diferentes vistas.

En una situación en la cual se desee capturar la distribución de radiancia de un cierto objeto macroscópico, la profundidad de campo puede determinarse mediante razonamientos puramente geométricos (véase la ecuación 2.11). Sin embargo, en un microscopio convencional no pueden despreciarse los efectos difractivos, por lo que la profundidad de campo del sistema vendrá dada por la siguiente expresión:

$$DOF^{conv} = \frac{\lambda}{NA^2} + \frac{\Delta x}{M NA}, \quad (5.1)$$

donde recordemos que λ es la longitud de onda de la iluminación, NA la apertura numérica del objetivo, M el aumento lateral del sistema, $M = f_{TL} / f_{OB}$, y Δx hace referencia al tamaño de los píxeles del sensor. Nótese que en la ecuación anterior, la profundidad de campo geométrica adquiere una expresión muy sencilla como consecuencia de la telecentricidad del sistema, de forma que $DOF_{geo}^{conv} = \Delta x / (M NA)$. Si consideramos que los píxeles que forman el sensor son lo suficientemente pequeños, la profundidad de campo de un microscopio convencional queda definida fundamentalmente por el término difractivo, de manera que:

$$DOF^{conv} \approx \frac{\lambda}{NA^2}. \quad (5.2)$$

Sin embargo, cuando consideramos un microscopio de Imagen Integral, la situación es radicalmente diferente, ya que en este caso el PRO se encuentra conjugado con el plano de las microlentes, siendo el período p de las mismas el que define el tamaño del píxel equivalente no siendo posible, por tanto, despreciar su contribución. De esta forma, la profundidad de campo de las reconstrucciones generadas computacionalmente puede obtenerse fácilmente como:

$$DOF_{rec}^{IMic} = \frac{\lambda}{NA^2} + \frac{p}{M NA}. \quad (5.3)$$

Teniendo en cuenta que las microlentes han de ser lo suficientemente grandes en relación al patrón de difracción para satisfacer las condiciones de

la teoría parageométrica (ver capítulo 3), la ecuación 5.3 puede expresarse de manera compacta como:

$$DOF_{rec}^{IMic} = \frac{\lambda}{2NA^2} (2 + \mu), \quad (5.4)$$

donde se ha considerado que $p = \mu\rho'$, siendo $\rho' = \lambda M / 2NA$ el límite de resolución del microscopio, expresado en el espacio imagen (ver ecuación 3.7).

Análogamente, es posible obtener una expresión para la profundidad de campo de las diferentes vistas ortográficas obtenidas con un IMic. En este caso y de acuerdo con el proceso de generación de vistas explicado en la sección 2.4.2, el tamaño del píxel equivalente puede expresarse como el producto $p \cdot \mu$, de manera que [88]:

$$DOF_{vistas}^{IMic} = \frac{\lambda}{2NA^2} (2 + \mu^2). \quad (5.5)$$

De acuerdo con las ecuaciones 5.4 y 5.5 podemos afirmar que la profundidad de campo, tanto de las reconstrucciones en profundidad como de las vistas ortográficas obtenidas con un IMic es usualmente muy pequeña, del orden de unas pocas micras, especialmente cuando la apertura numérica del objetivo es alta. De esta forma, las secciones del objeto que estén fuera de la DOF del microscopio producen en el plano de las microlentes una señal muy desenfocada, lo que hace imposible su recuperación incluso mediante sofisticados algoritmos de procesamiento óptico. Así, a pesar de ser posible calcular la reconstrucción en un elevado número de planos, únicamente se podrá reenfocar aquellas regiones del objeto situadas dentro de la profundidad de campo dada por la ecuación 5.5.

5.2. Aumento de la profundidad de campo mediante la inserción de una lente líquida

De acuerdo con lo expuesto en la sección anterior, parece necesario aumentar la profundidad de campo en un IMic con el fin de aumentar el

número de planos efectivos de reconstrucción. La inserción, en el plano adecuado, de una lente líquida permitirá, por un lado, aumentar la profundidad de campo del sistema, al mismo tiempo que se mantienen fijos el resto de variables.

Una lente líquida (*LL*) es una lente plano-convexa en la que es posible modificar la curvatura del dioptrio esférico, cambiando así su longitud focal. Las lentes sintonizables o más concretamente las lentes sintonizables eléctricamente (*ETL*, del inglés *electrically tunable lens*), han sido empleadas para diversas aplicaciones en los últimos años. Sin embargo, una de las más interesantes en lo que se refiere a imagen 3D, es la del empleo de una *ETL* para modificar la posición del plano de referencia objeto, tanto en un sistema de imagen integral de campo cercano [82] como en microscopía [83]-[85], donde se obtiene de manera rápida un barrido axial de la muestra, sin necesidad de introducir movimientos mecánicos que puedan desestabilizar el sistema.

Para entender cuáles son las modificaciones que es necesario llevar a cabo en la configuración de un microscopio de imagen integral, consideremos en primer lugar un sistema óptico compuesto por dos lentes acopladas L_1 y L_2 de distancia focal f_1 y f_2 , tal y como se muestra en la Figura 40. Cada uno de los dos sistemas independientes queda perfectamente definido por la posición de sus planos focales y sus planos principales. De acuerdo con los principios de la Óptica Geométrica, cualquier sistema óptico, por complejo que sea, puede expresarse a través de un único par de planos principales y focales, calculados a partir de los dioptrios que componen cada sistema individual, de manera que el estudio se simplifica notablemente [48]. Así, la distancia focal del sistema equivalente f_T puede calcularse como:

$$f_T = \frac{f_1 f_2}{f_1 + f_2 - e}, \quad (5.6)$$

siendo e la distancia entre el plano principal imagen de L_1 y el plano principal objeto de L_2 .

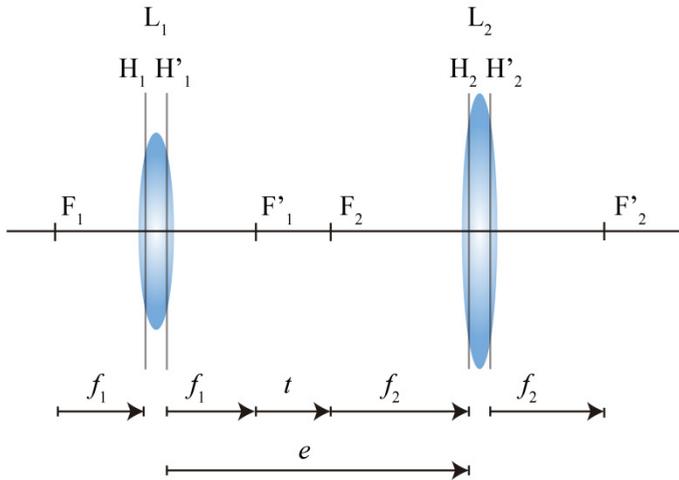


Figura 40. Sistema compuesto por dos lentes de distancia focal f_1 y f_2 respectivamente.

Por otra parte, la posición de los planos principales H_T y H'_T viene dada a través de las siguientes relaciones:

$$H_1 H_T = \frac{e f_1}{f_1 + f_2 - e} \quad (5.7)$$

$$H'_2 H'_T = \frac{-e f_2}{f_1 + f_2 - e}, \quad (5.8)$$

siendo H_1 y H'_2 la posición del plano principal objeto de L_1 , y del plano principal imagen de L_2 , respectivamente.

Supongamos ahora que la lente L_2 del sistema acoplado se sitúa justo en el plano focal imagen de L_1 , de manera que la distancia entre los centros de ambas lentes sea $e = f_1$. En este caso particular, las ecuaciones 5.6-5.8 pueden reescribirse de la siguiente manera:

$$f_T = f_1, \quad (5.9)$$

y

$$H_1 H_T = \frac{f_1^2}{f_2} \quad (5.10)$$

$$H_2' H_T' = -f_1. \quad (5.11)$$

De las relaciones anteriores se deduce, por una parte, que el sistema óptico equivalente al conjunto de lentes dispuestas y acopladas en la forma que acabamos de exponer tiene una distancia focal efectiva que es igual a la de la primera lente, de manera que la inserción de la segunda lente no modifica la distancia focal del sistema global, como tampoco se modifica la posición del foco imagen. Por otro lado, vemos que la posición del plano principal objeto del sistema equivalente H_T se encuentra desplazada con respecto a la posición de H_1 , una cantidad Δ que es directamente proporcional a la potencia de la segunda lente, $P_2 = 1/f_2$:

$$\Delta = \frac{f_1^2}{f_2} = P_2 f_1^2. \quad (5.12)$$

Por analogía con el sistema que acabamos de presentar podemos concluir que, la inserción de una lente líquida sobre el plano focal imagen de un objetivo de microscopio (esto es, el plano de la pupila) permite modificar la posición del plano focal objeto, manteniendo invariante el resto de parámetros del objetivo, es decir, su aumento y poder de resolución. Nótese que la inserción de la lente líquida en esta posición no altera la telecentricidad del sistema original.

En la Figura 41 se muestra un esquema de un IMic al que se le ha introducido una LL en el plano especificado. De acuerdo con la ecuación 5.9, la distancia focal del subsistema objetivo-LL será

$$f_T = f_{OB}, \quad (5.13)$$

mientras que la posición del plano principal objeto del sistema equivalente permite expresar el correspondiente desplazamiento del PRO como:

$$\Delta = P_{LL} f_{OB}^2, \quad (5.14)$$

pudiendo por tanto obtener desplazamientos positivos o negativos, en función de los valores de la potencia de la LL.

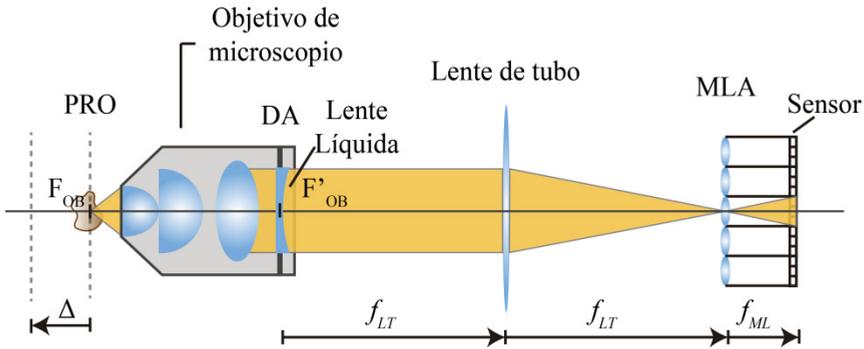


Figura 41. Configuración de un IMic para aumentar la profundidad de campo de las imágenes reconstruidas. La LL se sitúa sobre el plano de la pupila del objetivo, de manera que se produce una variación del PRO en función de la potencia de la LL, sin variar el resto de parámetros del sistema.

5.3. Resultados experimentales

De acuerdo con el método presentado en la sección anterior para aumentar la profundidad de campo de un microscopio de imagen integral, se llevó a cabo el siguiente experimento. Primeramente, se construyó un IMic utilizando un objetivo de microscopio de aumento nominal 20x y apertura numérica $NA = 0.4$, y una lente de tubo de distancia focal $f_{LT} = 100 \text{ mm}$ ¹⁴. Con el fin de aprovechar al máximo el poder de resolución del objetivo, se utilizó una matriz de microlentes de período $p = 80 \text{ }\mu\text{m}$ y apertura numérica $NA_{ML} = 0.023$. De esta forma, es posible satisfacer la ecuación 3.8 con gran

¹⁴ Como el aumento nominal se define para una lente de tubo de focal $f_{LT} = 200 \text{ mm}$, al cambiar la lente de tubo el aumento efectivo será $M_{ef} = 10$. Sin embargo, al insertar posteriormente un *relay* de aumento $M_R = 0.5$, es posible recuperar el valor original.

precisión sin necesidad de modificar la apertura numérica efectiva del objetivo de microscopio. Para realizar las capturas se empleó la misma cámara que en los experimentos previos (Canon EOS 450D, sensor CMOS con píxeles de tamaño $5.5 \mu\text{m}$ y objetivo macro 1:1).

Por otra parte, para desplazar el plano de referencia objeto se utilizó una lente líquida de diámetro $\phi_{LL} = 3.5 \text{ mm}$ (ARCTIC 39N0, fabricada por VARIOPTIC (ver Figura 42)), insertada en el plano de la pupila del objetivo.

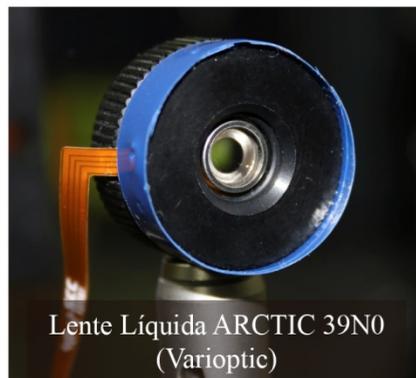


Figura 42. Lente líquida empleada en el experimento.

El funcionamiento de la lente líquida está basado en el principio conocido como *electrowetting*. La lente contiene en su interior dos líquidos de igual densidad pero diferente índice de refracción. La aplicación de una cierta tensión eléctrica modifica la curvatura de la interfase y, por ende, su potencia óptica P_{LL} [86],[87]. Existe un rango definido por un valor mínimo y un valor máximo de la potencia inducida, $P_{LL}(m^{-1}) \in [-5, +15]$, para el cual la relación entre ésta y el voltaje aplicado es lineal, pudiendo expresarse a través de la siguiente ecuación [84]:

$$P_{LL}(T) = S(T)[V - V_0(T)], \quad (5.15)$$

siendo T la temperatura ambiental¹⁵, medida en grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$). En particular, para una temperatura de 25°C , los parámetros de la ecuación anterior toman los valores $S(25) = 0.96 \text{ (m}\cdot\text{V)}^{-1}$ y $V_0(25) = 44 \text{ V}$, según especificaciones del fabricante.

Teniendo en cuenta la dificultad para acceder físicamente al plano de la pupila del objetivo de microscopio, se hizo uso de un *relay* constituido por dos lentes LR_1 y LR_2 de distancia focal f_{LR_1} y f_{LR_2} respectivamente, y dispuestas de manera afocal (ver Figura 43). Dado que el diámetro de la lente líquida tiene un tamaño de $\phi_{LL} = 3.5 \text{ mm}$, y puesto que éste resulta ser menor que el tamaño de la pupila de salida del objetivo $2r_p = 7 \text{ mm}$, una adecuada elección de las lentes que conforman el *relay* permite, además, ajustar ambos tamaños. De esta forma, se utilizaron dos lentes de distancia focal $f_{LR_1} = 150 \text{ mm}$ y $f_{LR_2} = 75 \text{ mm}$, respectivamente, de manera que el aumento proporcionado por el *relay* en el plano focal imagen de LR_2 fuese $M_R = 0.5$.

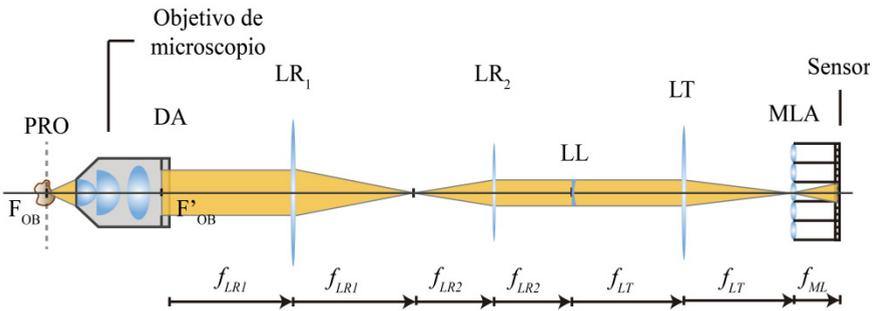


Figura 43. Esquema del montaje experimental para aumentar la profundidad de campo en un IMic. Para introducir la lente líquida en el plano de la pupila del objetivo de microscopio, se utilizó un *relay* consistente en dos lentes dispuestas en configuración afocal.

¹⁵ Pese a esta dependencia con la temperatura, variaciones de $\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en las condiciones ambientales producen únicamente una incertidumbre del 1% en la determinación de la potencia inducida P_{LL} .

Puesto que la lente líquida no se sitúa directamente sobre el plano definido por el DA del objetivo, sino sobre un plano conjugado con éste por medio del *relay*, la potencia efectiva inducida en la LL vendrá dada por

$$P_{LL}^{ef} = P_{LL} M_R^2, \quad (5.16)$$

de manera que la ecuación que relaciona el desplazamiento del PRO con la potencia inducida debe reescribirse como:

$$\Delta = P_{LL} M_R^2 f_{OB}^2. \quad (5.17)$$

Como objeto se utilizó una muestra consistente en unas fibras de algodón tintadas mediante tinte fluorescente. La muestra fue iluminada con un láser de longitud de onda $\lambda = 532$ nm, junto con un conjunto de filtros y espejos dicroicos con el fin de dejar pasar a través del sistema únicamente la luz correspondiente a la longitud de onda de emisión de la muestra fluorescente. En la Figura 44 se muestra una fotografía del experimento llevado a cabo en nuestro laboratorio. En la imagen puede verse la región del sistema comprendida entre el PRO y la LL.

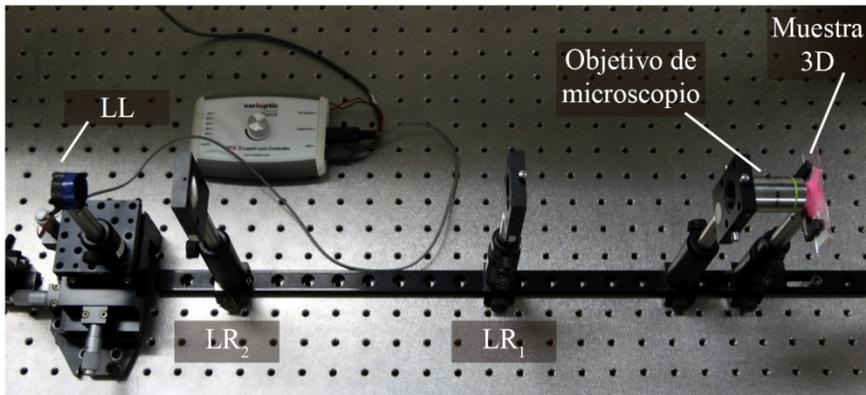


Figura 44. Montaje experimental para aumentar la profundidad de campo en un microscopio de imagen integral. En la fotografía se muestra la región del sistema comprendida entre el PRO y la LL.

En total se capturaron tres imágenes integrales, correspondientes a tres posiciones axiales diferentes del PRO de la muestra. Para modificar la posición del plano de referencia objeto, se llevó a cabo una modificación del voltaje aplicado a la lente líquida. En la Figura 45 se muestran las capturas realizadas según el procedimiento que se acaba de describir. El voltaje aplicado en cada caso fue de $V = 38.0$ V (Figura 45 (a)), $V = 44.0$ V (Figura 45 (b)) y $V = 50.0$ V (Figura 45 (c)).

Los valores de la potencia inducida en la lente líquida y el consiguiente desplazamiento del PRO, en cada caso, aparecen reflejados en la siguiente tabla:

V (V)	P_{LL} (m^{-1})	Δ (mm)
38.0	-5.76	-0.14
44.0	0.00	0.00
50.0	5.76	0.14

Tabla 2. Valores obtenidos para la potencia inducida en la LL y el desplazamiento del plano de referencia objeto, como consecuencia del voltaje aplicado.

A partir de las capturas mostradas en la Figura 45, se calcularon las correspondientes subimágenes por medio del algoritmo de generación de vistas. En la Figura 46 puede verse la subimagen central, asociada a cada una de las capturas realizadas. De acuerdo con estas imágenes es fácil comprobar que la profundidad de campo de un IMic es lo suficientemente pequeña en relación al espesor de la muestra 3D, como para considerar que a efectos prácticos tan sólo existe un único plano enfocado en las vistas generadas. En consecuencia y tal y como se expuso al comienzo de este capítulo, la reconstrucción en profundidad a partir de las capturas individuales tan sólo proporciona el reenfoque de una pequeña región de la muestra, tal y como puede verse en la Figura 47.

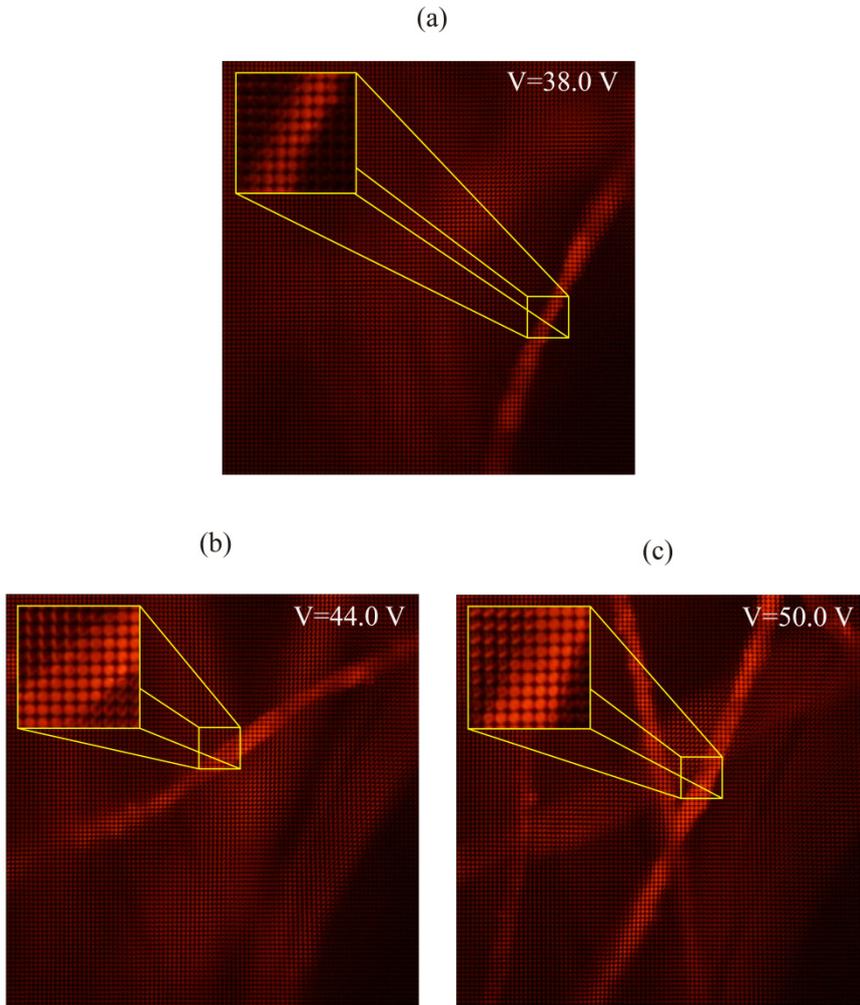


Figura 45. Imagen integral capturada con el IMic correspondiente a un voltaje de la lente líquida de (a) 38.0 V, (b) 44.0 V y (c) 50.0 V, respectivamente.

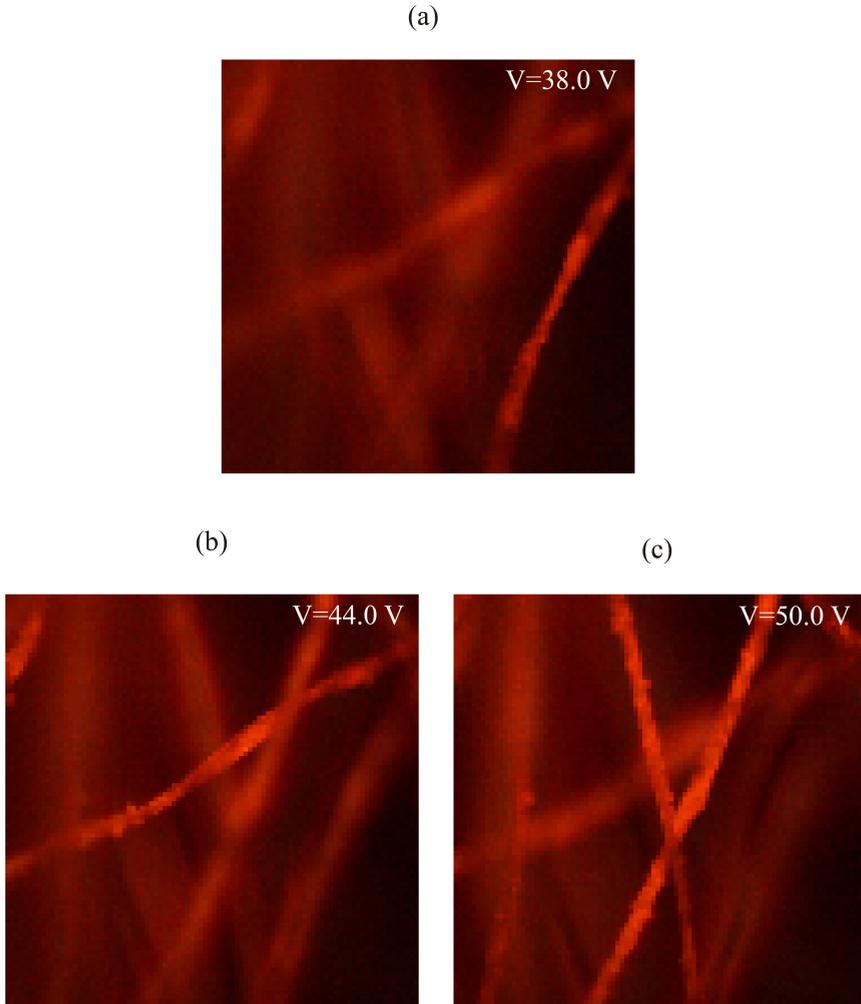


Figura 46. Vista central de la muestra 3D obtenida, mediante el correspondiente algoritmo de trasposición a partir de las imágenes integrales mostradas en la Figura 53 para un voltaje de la lente líquida de (a) 38.0 V, (b) 44.0 V y (c) 50.0 V, respectivamente.

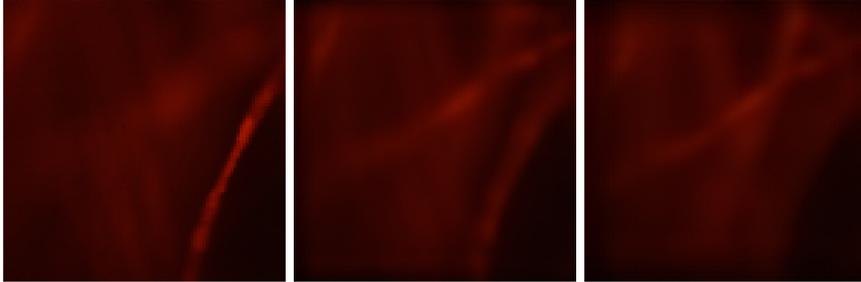


Figura 47. Reconstrucción en profundidad a partir de la captura correspondiente a la aplicación de un voltaje de $V = 38.0$ V en la LL. La profundidad de campo es, como puede verse, muy pequeña. En consecuencia tan sólo es posible obtener un reenfoque adecuado en un único plano de la muestra 3D.

La combinación de las imágenes proporcionadas por el algoritmo de reenfoque correspondientes a las diferentes capturas realizadas, permite aumentar la profundidad de campo de la reconstrucción, tal y como se muestra en la Figura 48.

En conclusión, podemos decir que la inserción de una lente líquida en el plano pupilar de un objetivo de microscopio permite modificar la configuración clásica del microscopio de imagen integral. La aplicación de una cierta tensión variable a la LL produce una variación en la potencia óptica de la misma, provocando, en consecuencia, un desplazamiento del PRO conjugado con el plano en el que se sitúa la matriz de microlentes. Así, es posible registrar un conjunto de imágenes integrales asociadas a posiciones axiales del PRO diferentes. La combinación de las reconstrucciones obtenidas a partir de las distintas capturas permite aumentar la profundidad de campo, en comparación con las reconstrucciones obtenidas a partir de una única captura individual [88].

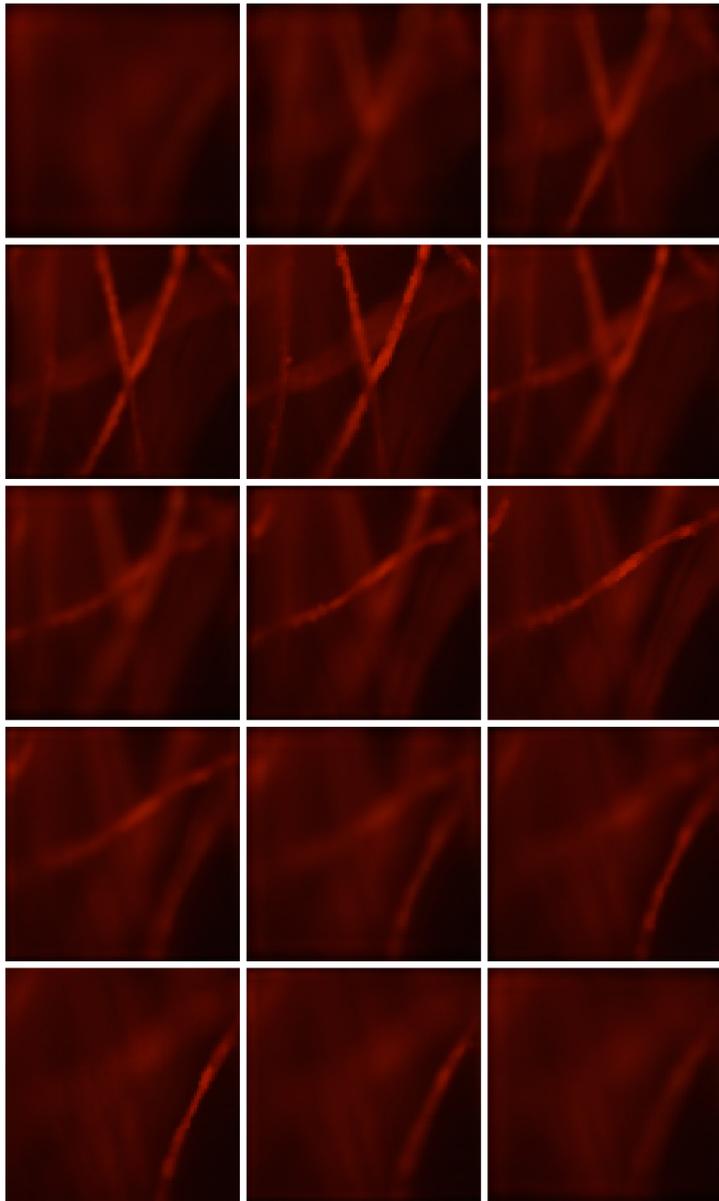


Figura 48. Extensión de la profundidad de campo en un IMic. La reconstrucción en profundidad tiene en cuenta las reconstrucciones obtenidas a partir de las imágenes integrales individuales.

Capítulo 6

El Microscopio Integral en el dominio de Fourier

A lo largo de esta Tesis se ha podido constatar cómo la información registrada por medio de un microscopio de imagen integral permite realizar la reconstrucción computacional de una cierta muestra 3D. Sin embargo, la baja resolución espacial obtenida en las reconstrucciones con respecto a la resolución proporcionada por un microscopio convencional, junto con la pequeña profundidad de campo de las mismas, representan los dos principales inconvenientes de los sistemas de microscopía integral.

En este capítulo mostraremos cómo, a partir de unas sencillas modificaciones en la configuración del microscopio de imagen integral, es posible registrar de manera directa las distintas perspectivas de la muestra. En particular, se propone la implementación de un microscopio integral mediante la inserción de un conjunto de lentes en el plano del diafragma de apertura del objetivo de microscopio [89],[90]. La reconstrucción de la escena a partir de las vistas capturadas permitirá obtener imágenes cuya resolución es 1.4 veces mayor que las correspondientes imágenes proporcionadas por un IMic tradicional, así como incrementar la profundidad de campo del sistema.

6.1. Configuración del microscopio de Imagen Integral en el dominio de Fourier

Considérese un microscopio de imagen integral como el representado en la Figura 49.

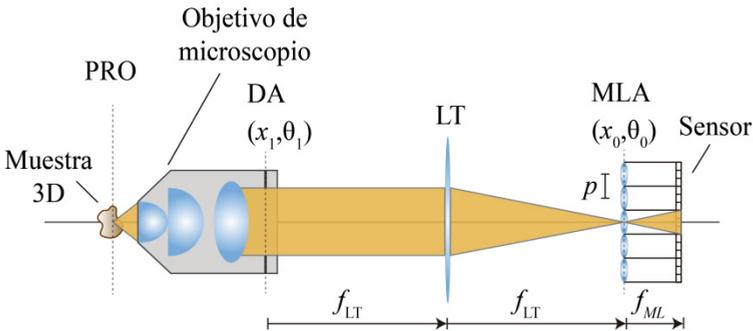


Figura 49. Esquema de un IMic. A través de la matriz de transferencia del sistema es posible obtener la relación entre las coordenadas de la función plenóptica en el plano de la MLA (x_0, θ_0) y el plano del D.A. (x_1, θ_1) .

De acuerdo con las transformaciones básicas de traslación y refracción expuestas en el capítulo 2, es posible obtener la distribución de radiancia en el plano del diafragma de apertura del objetivo de microscopio, mediante el correspondiente mapa de radiancia representado en el plano de las microlentes. La relación entre las coordenadas espaciales y angulares de ambos planos queda determinada por la matriz de transferencia inversa A^{-1} del sistema

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix} = A^{-1} \begin{pmatrix} x_0 \\ \theta_0 \end{pmatrix}, \quad (6.1)$$

con

$$A = \begin{pmatrix} 1 & -f_{LT} \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 1/f_{LT} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -f_{LT} \\ 0 & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & -f_{LT} \\ 1/f_{LT} & 0 \end{pmatrix}. \quad (6.2)$$

De esta forma, es fácil obtener que:

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & f_{LT} \\ -1/f_{LT} & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_0 \\ \theta_0 \end{pmatrix}. \quad (6.3)$$

Esta ecuación pone de manifiesto la relación existente entre la información contenida en el plano de la matriz de microlentes y la información en el plano del diafragma de apertura del objetivo de un microscopio de imagen integral. En la Figura 50 se muestra la representación de la función plenóptica en el diagrama espacio-angular, para los dos planos considerados. Esta relación es análoga a la relación que existe entre los sistemas de imagen integral de campo cercano y los sistemas de imagen integral de campo lejano, tal y como se vio en la sección 2.3.2.4. Sin embargo, en microscopía integral la relación de transposición resulta particularmente interesante por tratarse de un sistema telecéntrico. Como consecuencia de esta telecentricidad, la matriz de transferencia inversa del sistema entre el plano de la MLA y el plano pupilar es una matriz con elementos nulos en su diagonal (ver ecuación 6.3). De esta forma, la relación entre ambos planos es una transposición pura de la información espacio-angular. Dicho de otra manera, la información capturada por un IMic en su configuración clásica, trabajando con una matriz de Q microlentes y p píxeles por microlente, es la misma, aunque ordenada de manera diferente, que la capturada por un microscopio en el cual se ha insertado una matriz de p lentes sobre el plano de la pupila, con Q píxeles por lente.

Esta relación sienta las bases del nuevo microscopio integral, el cual se fundamenta en la posibilidad de obtener directamente un conjunto de vistas de una muestra 3D, mediante la inserción de una matriz de lentes en el plano de la pupila del objetivo de microscopio. A este nuevo microscopio lo llamaremos Microscopio de imagen integral en el dominio de Fourier¹⁶ o

¹⁶ De acuerdo con la Teoría de la Difracción, en el plano focal imagen de una lente se encuentra la transformada de Fourier de la distribución de amplitudes de un objeto situado en su plano focal objeto. Por ello, al plano de la pupila de un objetivo de microscopio se le llama, típicamente, el plano de Fourier.

simplemente Microscopio integral de Fourier, al que por simplicidad llamaremos FIMic (del inglés *Fourier Integral Microscope*).

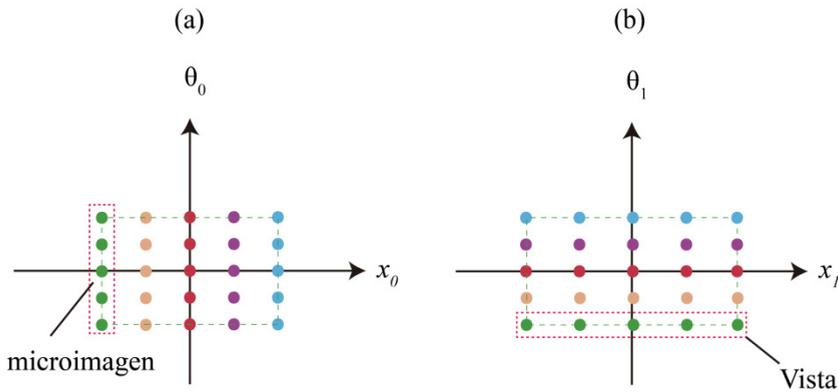


Figura 50. Diagrama espacio-angular en (a) el plano de la MLA y (b) el plano del DA, de un IMic.

6.1.1. Implementación del microscopio integral de Fourier

En la práctica, la implementación de un FIMic puede realizarse atendiendo a tres alternativas diferentes, aunque esencialmente equivalentes. La primera opción consiste en insertar una matriz de lentes directamente en el plano de la pupila del objetivo, junto con un sensor de imagen colocado justo en el plano focal imagen de las lentes de la matriz (ver Figura 51 (a)). Este diseño, a pesar de ser muy compacto, no permite aumentar el número de píxeles de la imagen integral registrada con respecto a la imagen integral obtenida con un IMic, ya que en definitiva es la apertura numérica del objetivo la que determina en ambos casos el área del sensor que contribuye al registro de la imagen y, por tanto, el número de píxeles totales de la imagen integral. La segunda posibilidad consiste en insertar en el plano del DA una matriz de micro-cámaras, cada una de ellas con su propio sensor de imagen (ver Figura 51 (b)). Este diseño es quizás el más efectivo puesto que, además de ser compacto, proporciona una mayor resolución así como una mayor

profundidad de campo. Sin embargo, debido a las limitaciones propias de la fabricación de cámaras digitales de reducido tamaño, únicamente sería posible su implementación utilizando objetivos de alta apertura numérica.

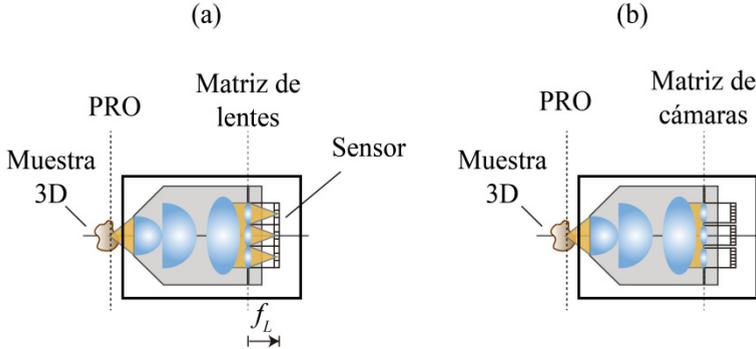


Figura 51. Implementación de un microscopio integral de Fourier a partir de (a) una matriz de lentes de distancia focal f_L o (b) una matriz de cámaras.

Sacrificando la compacidad del sistema total, es posible considerar una tercera posibilidad que incluye un *relay* constituido por dos lentes, tal y como se muestra en la Figura 52. La principal ventaja de esta configuración es que permite trabajar con cualquier objetivo de microscopio, ya que el tamaño de la imagen de la pupila queda determinado por el aumento proporcionado por el sistema *relay*, siendo este aumento $M_R = -f_{LR2}/f_{LR1}$.

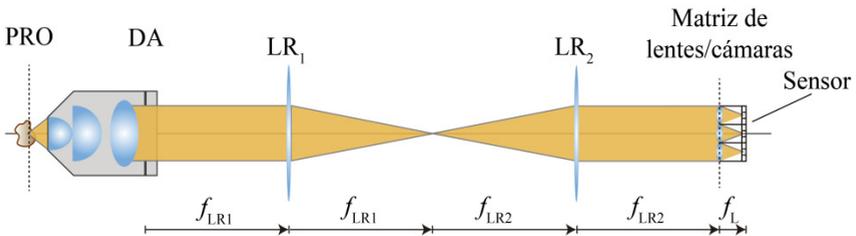


Figura 52. Implementación de un FIMic haciendo uso de un relay compuesto por dos lentes dispuestas en configuración afocal.

6.1.2. Relación entre el campo visual del objetivo de microscopio y la apertura numérica de las microlentes en un microscopio integral de Fourier

De la misma forma que en un IMic tradicional la apertura numérica de las microlentes debe estar en consonancia con la apertura numérica del objetivo de microscopio (véase la ecuación 3.8), en un FIMic las características de las microlentes también deben escogerse con cuidado, con el fin de evitar un solapamiento entre las imágenes elementales registradas en el sensor. Para entender cuál es la restricción al tamaño de las microlentes en este caso, consideremos un objetivo de microscopio como el representado en la Figura 53. El objetivo de microscopio está compuesto por un conjunto de lentes y diafragmas que, en definitiva, limitan el campo visual del mismo. Este campo visual queda definido mediante el ángulo w , cuya tangente puede expresarse como:

$$w = \frac{R}{f_{OB}}, \quad (6.4)$$

siendo R el radio del campo visual, medido en unidades de longitud. Sólo en el caso en el que el campo visual definido por w coincida con la apertura numérica de las microlentes insertadas en el plano de la pupila del objetivo, se producirá un correcto registro de las EIs. Matemáticamente, esto puede expresarse como:

$$\frac{R}{f_{OB}} = \frac{p_L}{2f_L}, \quad (6.5)$$

donde p_L y f_L representan, respectivamente, el período y la distancia focal de las microlentes.

El cumplimiento de la ecuación 6.5 garantiza, por tanto, un correcto aprovechamiento de los píxeles del sensor, sin huecos ni solapamiento entre las imágenes elementales capturadas.

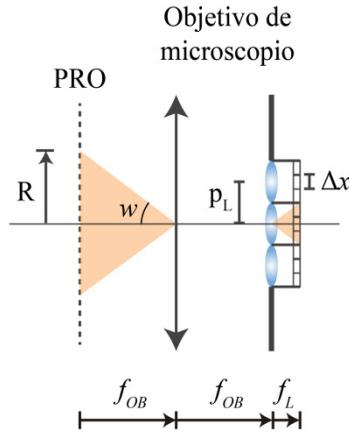


Figura 53. Relación entre el campo visual del objetivo de microscopio y la apertura numérica de las microlentes en un FIMic.

6.1.3. Resolución lateral y profundidad de campo en el microscopio integral de Fourier

La configuración del microscopio integral de Fourier permite realizar una captura directa de las diferentes imágenes elementales de una muestra 3D, lo que presenta una doble ventaja, como veremos a continuación. En primer lugar, recordemos que en un microscopio de imagen integral en su configuración tradicional, la resolución de las vistas se encuentra limitada por el tamaño de las microlentes, siendo el límite de resolución el definido a través de la siguiente ecuación:

$$\rho_{vistas}^{IMic} = \frac{2p_{ML}}{M}, \quad (6.6)$$

donde p_{ML} hace referencia al período de las microlentes contenidas en la MLA de un IMic tradicional. El valor de p_{ML} , sin embargo, debe ser lo suficientemente grande en relación al tamaño del disco de Airy generado sobre el plano de la matriz, ya que de lo contrario estaríamos sobrepasando los límites de la teoría parageométrica. Esta condición, expresada en la forma $p_{ML} = \mu\rho'$ (donde recordemos que μ es un número real y ρ' el límite de

resolución de un microscopio convencional en el espacio imagen), permite reescribir la ecuación anterior como:

$$\rho_{vistas}^{IMic} = \frac{2p_{ML}}{M} = \frac{2\mu\rho'}{M} = 2\mu\rho, \quad (6.7)$$

donde ρ es el límite de resolución del microscopio convencional, expresado en el espacio objeto. Nótese que el factor μ proporciona también el número de ángulos diferentes que se resuelven en cada microimagen, siempre y cuando el tamaño de los píxeles del sensor cumpla el criterio de Nyquist.

En un FIMic, sin embargo, la resolución de las vistas está limitada por el tamaño de la apertura numérica de las lentes involucradas en el proceso de captura, $NA_L = p_L/2f_L$ (ver Figura 53), de manera que:

$$\rho_{vistas}^{FIMic} = \frac{\lambda}{2\overline{NA}_L}, \quad (6.8)$$

siendo \overline{NA}_L la apertura numérica de dichas lentes en el espacio objeto. Dicha apertura numérica se encuentra relacionada con la apertura numérica efectiva del objetivo de microscopio a través de la expresión $\overline{NA}_L = NA / m$, siendo m el número de lentes introducidas en el plano de Fourier. De esta forma, el límite de resolución de las vistas capturadas con un FIMic puede expresarse como [91]:

$$\rho_{vistas}^{FIMic} = \frac{\lambda}{2\overline{NA}_L} = m\rho. \quad (6.9)$$

Así, una cuidadosa elección del número m de lentes insertadas en la pupila del objetivo permitirá obtener imágenes con mayor resolución, en comparación con las imágenes obtenidas con un IMic.

La segunda ventaja del microscopio integral de Fourier hace referencia a la profundidad de campo del sistema. Recordemos que en un IMic la profundidad de campo de las vistas ortográficas puede obtenerse a través de la expresión (véase el capítulo 6):

$$DOF_{vistas}^{IMic} = \frac{\lambda}{2NA^2} (2 + \mu^2). \quad (6.10)$$

Puesto que en un FIMic la matriz de lentes se introduce sobre el plano del DA del objetivo, la profundidad de campo del sistema estará determinada por el valor de la apertura numérica de las lentes introducidas, así como por el tamaño de los píxeles del sensor Δx , de manera que análogamente a la ecuación 5.1, es posible obtener la siguiente expresión:

$$DOF_{vistas}^{FIMic} = \frac{\lambda}{NA_L^2} + \frac{\Delta x}{M_L NA_L}, \quad (6.11)$$

donde $M_L = f_L / f_{OB}$ es el aumento lateral existente entre el PRO y el plano del sensor. Expresando la ecuación anterior en términos de la apertura numérica del objetivo y considerando el caso óptimo en el cual el tamaño del píxel satisface el criterio de Nyquist (i.e. $2\Delta x / M_L = \rho_{vistas}^{FIMic}$), se obtiene que:

$$DOF_{vistas}^{FIMic} = \frac{5}{4} m^2 \frac{\lambda}{NA^2}. \quad (6.12)$$

De acuerdo con las ecuaciones anteriores podemos concluir que, para una misma resolución espacial, la implementación de un microscopio integral de Fourier permite obtener diferentes vistas ortográficas con una profundidad de campo mayor que la correspondiente a las vistas obtenidas con un IMic tradicional. De la misma forma, el microscopio de Fourier proporciona imágenes con mayor resolución espacial en comparación con el IMic clásico y para una misma profundidad de campo.

6.2. Resultados experimentales

Para mostrar las ventajas del microscopio integral de Fourier frente al microscopio de imagen integral tradicional, se llevó a cabo un doble experimento. Por un lado, se realizó la captura de una muestra tridimensional a través de un FIMic así como a través del IMic tradicional para la comparación de las imágenes obtenidas. El mismo proceso se repitió

utilizando como objeto un test USAF 1951. De esta manera pudo cuantificarse la mejora en resolución obtenida con el microscopio de Fourier.

6.2.1. Captura y reconstrucción de una muestra 3D con un IMic

Para la implementación del microscopio de imagen integral tradicional se utilizó un objetivo de microscopio $20\times$, $NA=0.4$, una lente de tubo de distancia focal $f_{LT}=200$ mm y una matriz de microlentes de período $p=110$ μm y apertura numérica $NA_{mic}=0.01$. De acuerdo con las características de la matriz de microlentes, la apertura numérica del objetivo se redujo mediante la inserción de un diafragma iris hasta un valor efectivo de 0.2, con el fin de satisfacer la ecuación 3.8. Como muestra 3D se utilizó una pequeña porción de una lámina de papel de limpieza de lentes, tintada con marcador fluorescente. Estas láminas se utilizan, típicamente, para la limpieza de las lentes de los instrumentos ópticos. Sin embargo, debido a la baja densidad de fibras y a su espesor de aproximadamente unas 100 μm , estas láminas resultan particularmente útiles como objeto de prueba en diversos experimentos de microscopía. Para iluminar la muestra se utilizó un láser de longitud de onda $\lambda=532$ nm, así como un conjunto de filtros y espejos dicróicos para seleccionar adecuadamente la longitud de onda de emisión.

En la Figura 54 (a) se muestra la imagen integral registrada con el microscopio. La imagen está compuesta por 72×72 microimágenes, con un total de 27×27 píxeles cada una. A partir de esta imagen integral, es posible obtener las correspondientes subimágenes, de acuerdo con el algoritmo detallado en el capítulo 2. En la Figura 54 (b) pueden verse las 72×72 vistas ortográficas de la muestra.

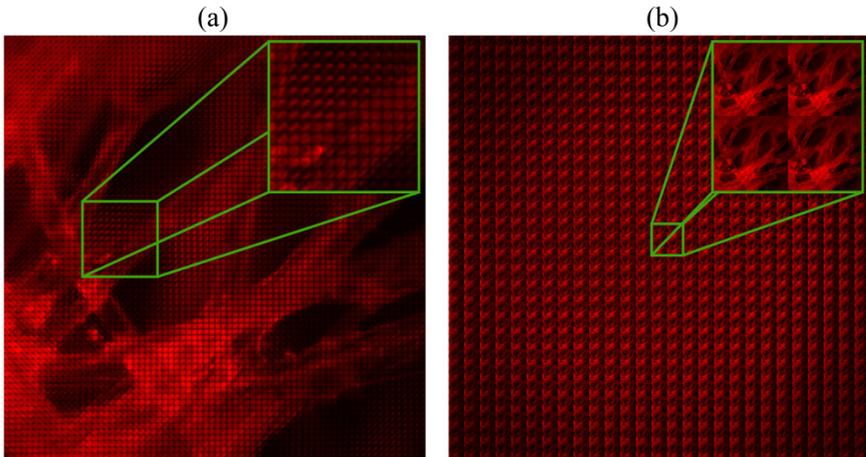


Figura 54. (a) Imagen integral capturada con un IMic. La imagen consta de 72×72 microimágenes, con 27×27 píxeles cada una. (b) Conjunto de 27×27 subimágenes obtenido a partir de (a).

En la figura siguiente puede verse la reconstrucción de la escena tras la aplicación de los correspondientes algoritmos. En la Figura 55 (a) y en la Figura 55 (b) se muestra la reconstrucción en profundidad de la muestra, pudiendo identificar dos planos diferentes de la misma. Por otra parte, en la Figura 55 (c) y Figura 55 (d) pueden verse dos de las perspectivas de la muestra extraídas de la imagen mostrada en la Figura 54 (b). Nótese el paralaje existente entre ambas imágenes.

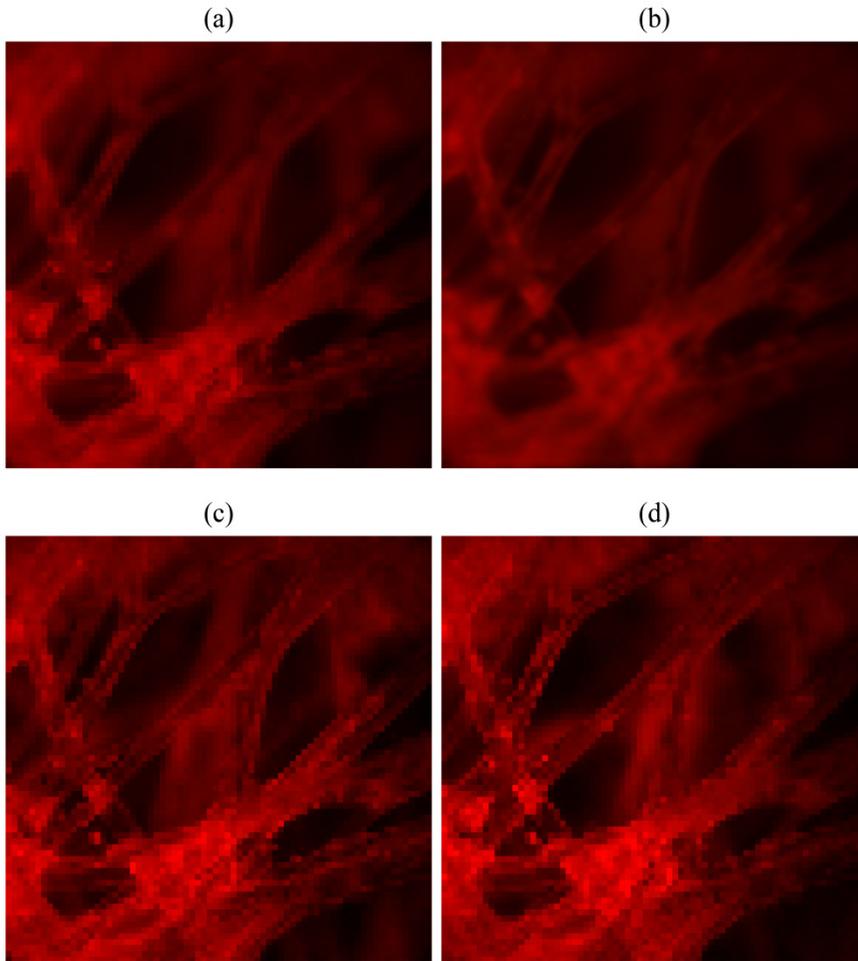


Figura 55. Reconstrucción de la muestra 3D capturada con el IMic. Reconstrucción en profundidad (a) y (b) y generación de vistas ortográficas (c) y (d).

Es importante destacar que la resolución de las reconstrucciones depende de la posición axial del plano de reconstrucción. Estas variaciones en la resolución pueden intuirse en las imágenes mostradas en la Figura 55. Con el fin de cuantificar esta variabilidad, se repitió el experimento anterior pero utilizando como objeto un test USAF 1951 situado a diferentes distancias z_0

del plano focal objeto del objetivo (ver Figura 56). En esta ocasión, el objeto fue iluminado incoherentemente. Nótese que cuando el PRO se sitúa justo en el foco del objetivo ($z_0 = 0.00$ mm), la imagen intermedia del test de resolución se forma sobre el plano de la MLA, de manera que cada una de las microimágenes es un círculo de irradiancia constante (ver Figura 57 (a)). Así, la resolución de la reconstrucción en este plano es relativamente pobre, pues se ve limitada por el tamaño de las microlentes contenidas en la matriz (ver Figura 57 (c)).

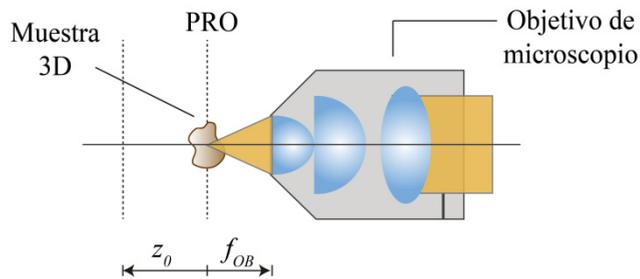


Figura 56. Desplazamiento axial del objeto con respecto al plano focal objeto del objetivo de microscopio.

Cambiando la posición axial del objeto es posible aumentar la resolución espacial de las reconstrucciones, puesto que éstas se llevan a cabo mediante la correspondiente superposición y suma de los píxeles de las subimágenes generadas computacionalmente. Para ilustrar esta ganancia en resolución, se realizó una segunda captura, con el objeto test situado a una distancia $z_0 = 0.03$ mm del plano focal del objetivo (Figura 57 (b)). A la vista de la reconstrucción mostrada en la Figura 57 (d), es posible afirmar que la resolución de la reconstrucción mejora notablemente cuando el objeto se sitúa fuera del foco del objetivo de microscopio. Sin embargo, esta resolución sigue estando lejos de la resolución proporcionada por un microscopio convencional (véase el capítulo 3). En la siguiente tabla se muestra el valor de la resolución, de acuerdo con el Anexo 2.

Posición axial del objeto z_0 (mm)	$\rho(\mu m)$
0.00	7.8
0.03	5.5

Tabla 3. Valores obtenidos para la resolución espacial de la reconstrucción a partir de la imagen integral obtenida con el objeto situado en dos posiciones axiales diferentes.

6.2.2. Captura y reconstrucción de una muestra 3D con un FIMic

Con el fin de mejorar la resolución espacial obtenida con un microscopio de imagen integral así como aumentar la profundidad de campo del sistema, se construyó un FIMic, de acuerdo con el esquema de la Figura 52. Para ello, se utilizó de nuevo un objetivo de microscopio $20x, NA = 0.4$ y un *relay* de aumento $M_R = 1$, compuesto por dos lentes de focales $f_{LR1} = f_{LR2} = 200$ mm, dispuestas en configuración afocal. En lugar de utilizar una matriz de cámaras, se llevó a cabo una captura de apertura sintética. La cámara digital (Canon 450D, con un objetivo macro 1:1) se desplazó a lo largo de las direcciones x e y de acuerdo con la disposición mostrada en la Figura 58. Para simular con mayor fidelidad una situación en la que una matriz de micro-cámaras digitales se situase en la pupila de salida del sistema, el diámetro del diafragma del objetivo de la cámara digital tuvo que ser reducido hasta un valor igual al cociente $r_p / 2$, siendo r_p el radio de la pupila¹⁷. En la Figura 59 se muestra una fotografía del montaje experimental.

¹⁷ Estrictamente, en un caso general donde el aumento lateral sea distinto a la unidad, debe ser considerado el tamaño de la pupila en el espacio imagen, esto es, $2r_p / M$.

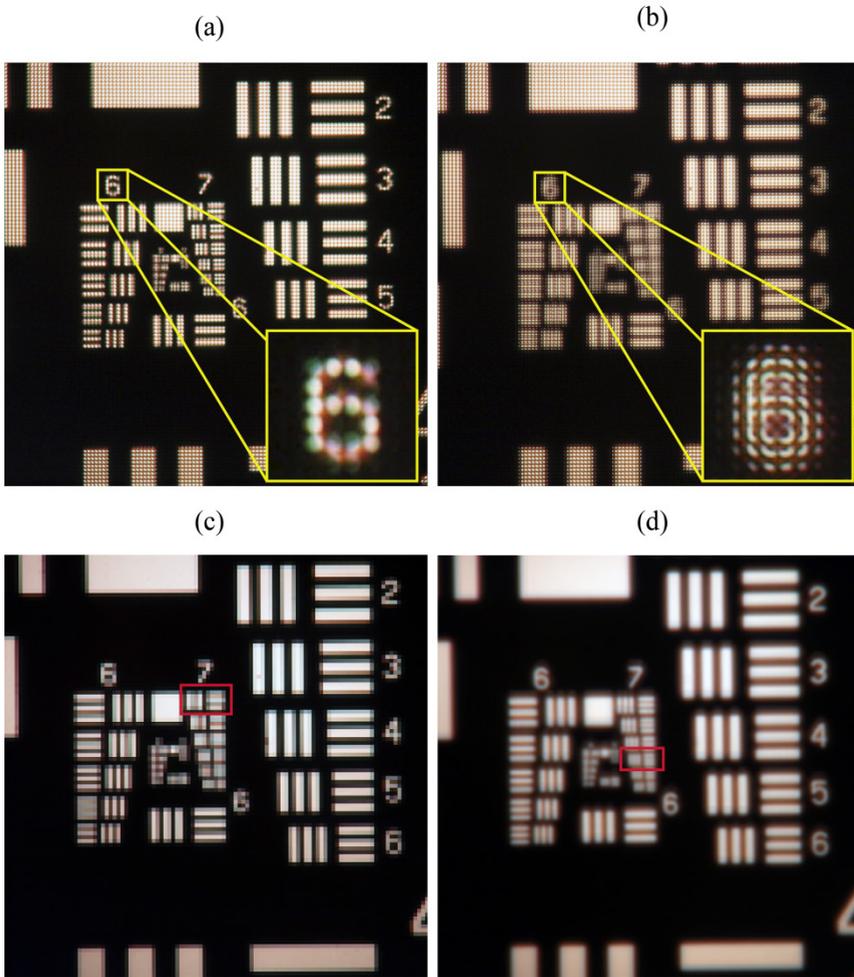


Figura 57. Imagen integral capturada con un IMic con el objeto situado a una distancia del foco del objetivo de (a) $z_0 = 0$ mm y (b) $z_0 = 0.03$ mm. En (c) y (d) se muestra la reconstrucción del test de resolución correspondiente a la imagen capturada en (a) y (b), respectivamente.

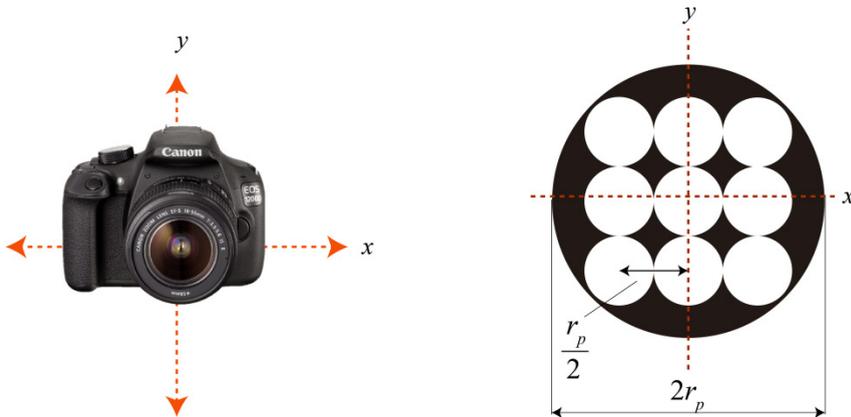


Figura 58. Desplazamiento de la cámara digital a lo largo de las direcciones x e y para registrar las EIs mediante un experimento de apertura sintética.

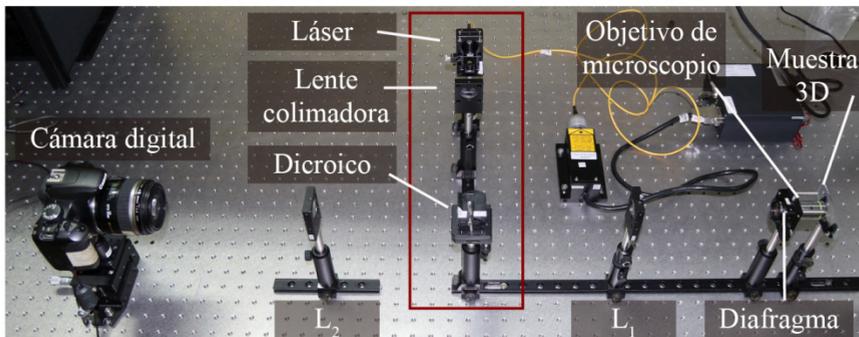


Figura 59. Montaje experimental del FIMic empleado para la verificación experimental de los conceptos presentados.

En total se capturó un total de 3x3 EIs, las cuales se muestran en la Figura 60. Cada imagen elemental consta de 720x720 píxeles.

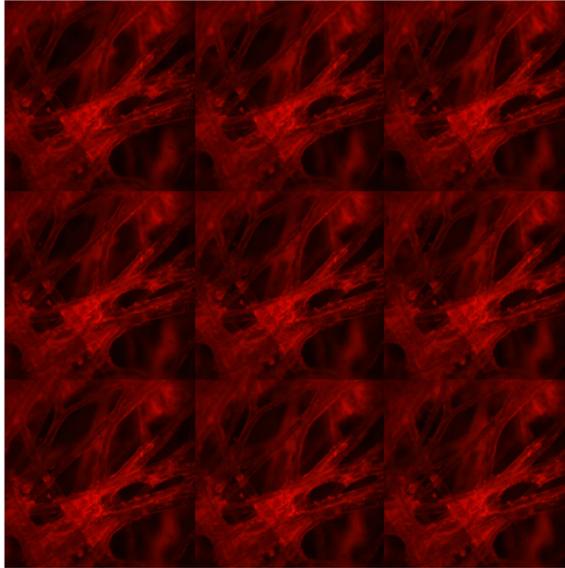


Figura 60. Imagen integral capturada con el microscopio de Fourier.

Al igual que en casos anteriores, la información contenida en la imagen integral permite reconstruir la irradiancia de la muestra tridimensional a diferentes profundidades. Sin embargo, en este caso no es necesario realizar el paso intermedio de cálculo de las subimágenes. En la Figura 61 (a) y Figura 61 (b) se pueden ver dos planos distintos de reconstrucción, obtenidos computacionalmente. Por otra parte, en la Figura 61 (c) y Figura 61 (d) se muestran dos vistas diferentes de la muestra. Nótese que en el caso de un FIMic, estas vistas se extraen directamente de la imagen integral. La comparación de las imágenes mostradas en la Figura 61 con las correspondientes imágenes obtenidas a partir de la captura realizada con un IMic (ver Figura 55) permite comprobar cómo efectivamente el microscopio integral de Fourier proporciona mejores resultados en términos de la resolución espacial tanto en las reconstrucciones en profundidad como de las diferentes vistas.

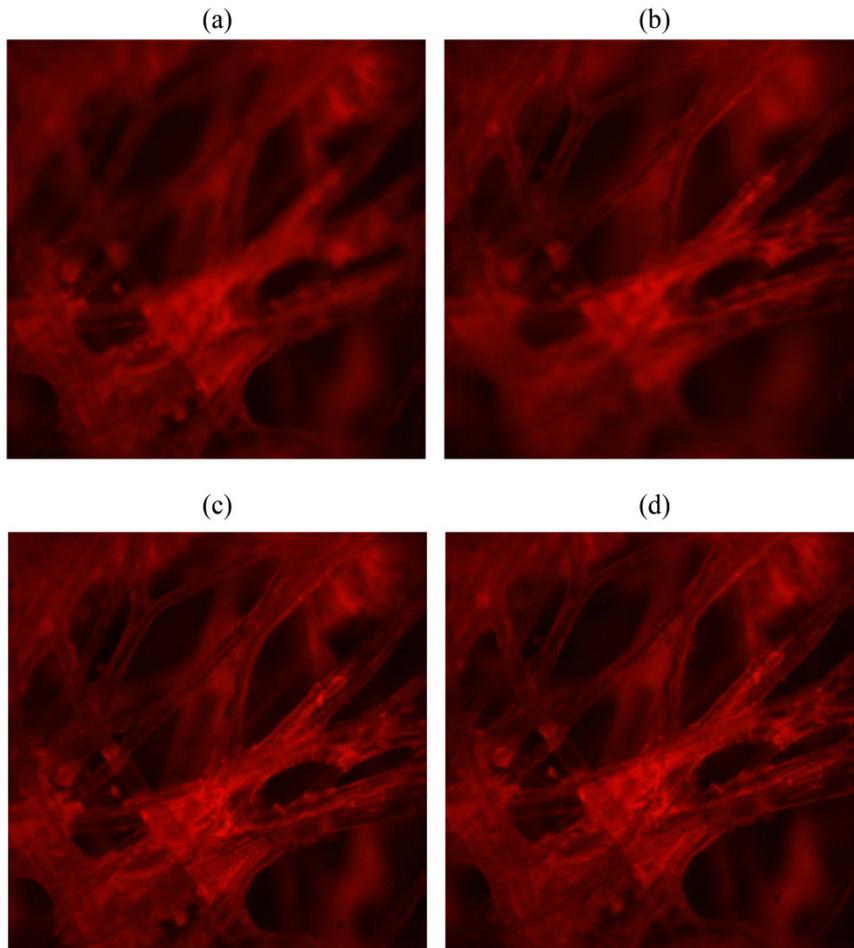


Figura 61. Reconstrucciones de la muestra a partir del conjunto de EIs capturadas con el FIMic. En (a) y (b) se muestran dos vistas diferentes capturadas directamente con el microscopio. En (c) y (d) es posible ver dos planos de reconstrucción obtenidos tras la aplicación del correspondiente algoritmo.

Finalmente, para cuantificar esta mejora en la resolución se registró la imagen integral de un test USAF 1951 iluminado incoherentemente y situado

en diferentes posiciones axiales frente al objetivo de microscopio, de la misma manera que se hizo con el microscopio de imagen integral tradicional (ver sección 6.2.1.). Para cada una de las posiciones del test USAF se capturaron 3x3 EIs, con sus 720x720 píxeles cada una. En la siguiente figura se muestra la reconstrucción del objeto para las posiciones axiales $z_0 = 0.00$ mm (Figura 62 (a)) y $z_0 = 0.03$ mm (Figura 62 (b)). De acuerdo con la figura, vemos que en ambos casos se obtiene una resolución lateral de $\rho = 3.9 \mu\text{m}$. De esta forma hemos constatado que, la captura de la imagen integral mediante un microscopio integral de Fourier, proporciona imágenes cuya resolución es 1.4 veces mejor que la resolución obtenida con un microscopio de imagen integral tradicional en el mejor de los casos (véase la Tabla 2). Además, esta resolución lateral es homogénea en un amplio intervalo axial, tal y como puede verse en la Figura 62.

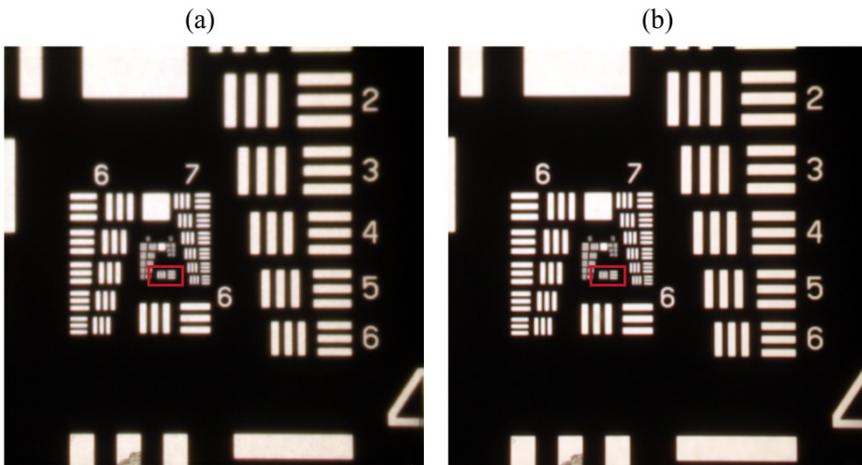


Figura 62. Reconstrucción del test USAF capturado con un FIMic, cuando el test se encontraba situado a una distancia (a) $z_0 = 0.00$ mm y (b) $z_0 = 0.03$ mm del plano focal objeto del objetivo de microscopio.

Capítulo 7

Reconstrucción de la escena 3D a través de la respuesta impulsional de un sistema de imagen integral

La posibilidad de realizar una reconstrucción en profundidad de una escena 3D es una de las principales aplicaciones de los sistemas de captura de imagen integral. Para ello, cada imagen elemental registrada por el sistema debe ser computacionalmente proyectada a través de una matriz de estenopes virtual, tal y como se vio en el capítulo 2. De manera equivalente, es posible obtener la reconstrucción mediante el adecuado desplazamiento de las imágenes elementales, y la posterior suma de los valores de los píxeles superpuestos [35]. De acuerdo con este modelo, se han desarrollado diferentes técnicas de reconstrucción [92]-[96]. Recientemente, se han propuesto algunas técnicas capaces de reconstruir axialmente la escena a través de la convolución con un conjunto de funciones Delta de Dirac [97]-[99].

En este capítulo presentamos un método de reconstrucción alternativo para obtener los distintos planos de foco de una escena tridimensional. El método está basado en la operación de desconvolución 2D de la imagen integral y la respuesta impulsional no difractiva del sistema [100], la cual, como se verá, depende de la posición axial del objeto.

7.1. Reconstrucción en sistemas de imagen integral de campo cercano

7.1.1. Respuesta impulsional no difractiva y proceso de captura en el sistema de imagen integral

Consideremos un sistema de captura de imagen integral de campo cercano como el representado en la Figura 63 (a). De acuerdo con lo expuesto en el capítulo 2, el PRO se encuentra conjugado con el plano del sensor a través de la matriz de microlentes, de manera que sobre el sensor se registrará un conjunto de imágenes elementales de la escena 3D. Dado un punto cualquiera de un objeto 3D localizado sobre un plano situado a una distancia z de la matriz de microlentes, es fácil ver que la proyección de los rayos luminosos que emergen de dicho punto a través de todas y cada una de las microlentes proporcionará sobre el sensor un conjunto de puntos equidistantes. De esta forma, la imagen integral registrada presentará un patrón periódico, cuyo período depende de la posición axial z :

$$P(z) = \phi \left(1 - \frac{g'}{z} \right). \quad (7.1)$$

Suponiendo que los píxeles del sensor son lo suficientemente grandes como para que el sistema no se encuentre limitado por la difracción, es posible considerar, en buena aproximación, que la imagen integral así registrada representa la respuesta impulsional o PSF (del inglés *point spread function*) del sistema. Así, la PSF $h(\mathbf{x}; z)$ de un sistema de imagen integral de campo cercano puede representarse como

$$h(\mathbf{x}; z) = \sum_{m_x} \sum_{m_y} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{m}P(z)), \quad (7.2)$$

donde el símbolo δ se refiere a la función delta de Dirac, y el vector $\mathbf{m} = (m_x, m_y)$ es un vector que denota el índice de las microlentes en las direcciones transversales x e y . De esta forma, las imágenes elementales

registradas en el sensor estarán centradas en las posiciones dadas por $\mathbf{x} = \mathbf{m}P(z)$.

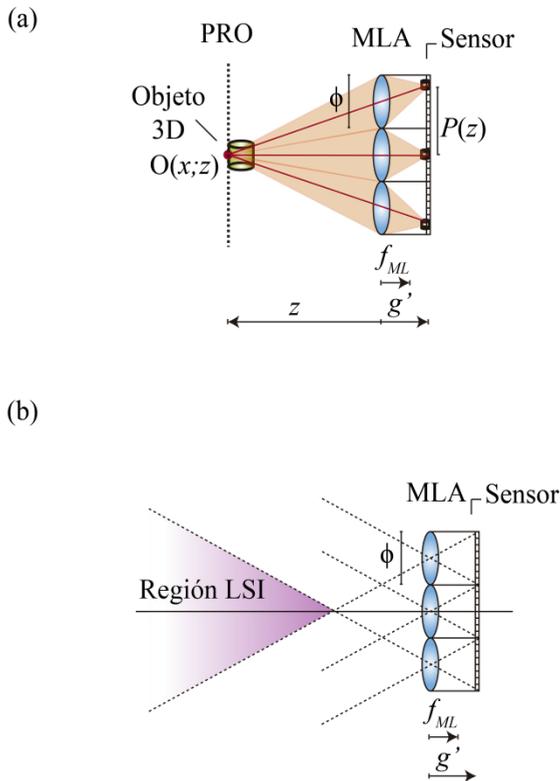


Figura 63. (a) Esquema de un sistema de imagen integral de campo cercano. (b) Delimitación de la región del espacio objeto para la cual el sistema puede ser considerado como un sistema 2D-LSI.

En la Figura 64 puede verse un esquema de la estructura de la PSF del sistema, para dos posiciones del plano objeto diferentes. Nótese que cuanto más cerca de la MLA se encuentre el objeto, mayor será el paralaje entre las distintas imágenes elementales, lo que en definitiva se traduce en una mayor separación entre los puntos que forman la respuesta impulsional.

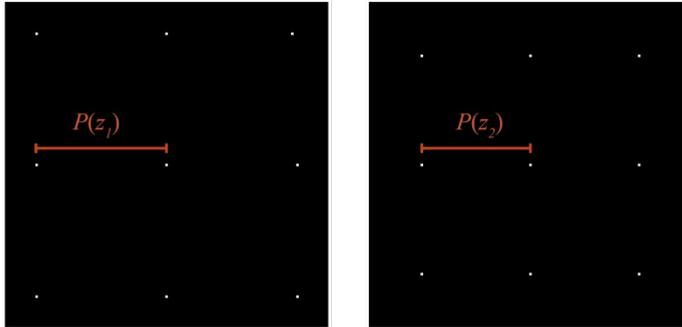


Figura 64. Respuesta impulsional no difractiva en un sistema de imagen integral de campo cercano, para un objeto puntual situado a una distancia (a) z_1 y (b) z_2 del plano de la MLA, siendo z_2 la distancia correspondiente al objeto más lejano.

Por otra parte, existe una cierta región en el espacio objeto (ver Figura 63 (b)) para la cual el sistema puede considerarse, plano a plano, como un sistema lineal e invariante a desplazamientos o 2D-LSI (del inglés *linear shift invariant*). Si el objeto 3D de interés se encuentra contenido dentro de esta región, entonces cada uno de los puntos que componen dicho objeto tendrá su correspondiente imagen en todas y cada una de las imágenes elementales formadas en el plano del sensor. Tal y como puede apreciarse en la figura, la región para la cual el sistema es LSI queda delimitada por el número Q de microlentes así como por la distancia entre la matriz y el plano del sensor, de manera que la posición axial de la escena en relación al plano de la MLA debe satisfacer, necesariamente, la condición $z \leq -(Q-1)g'$. De esta forma, dado un objeto 3D con distribución de irradiancia $O(\mathbf{x}; z)$, la distribución de intensidad 2D registrada en el sensor $I(\mathbf{x}; z)$, correspondiente a una sección arbitraria del objeto situada a una distancia z de la matriz, puede ser calculada como la convolución 2D entre una versión escalada del objeto, y la PSF dada por la ecuación 7.2, de manera que

$$I(\mathbf{x}; z) = \frac{1}{M_z^2} O\left(\frac{\mathbf{x}}{M_z}; \frac{z}{M_z^2}\right) \otimes_2 h(\mathbf{x}; z), \quad (7.3)$$

siendo $M_z = g'/z$ el aumento lateral y \otimes_2 el símbolo que representa la convolución 2D.

Así, en un sistema de imagen integral de campo cercano, la distribución de intensidad registrada en el plano del sensor asociada a la totalidad de la escena 3D, puede calcularse como:

$$I(\mathbf{x}) = \int_z I(\mathbf{x}; z) dz. \quad (7.4)$$

Sin embargo, debido al tamaño finito de los píxeles que conforman los sensores de imagen, la PSF no cambia de forma continua con z sino que lo hace de forma discreta. Por ello, existe un número finito N de PSFs posibles, cada una asociada a un plano diferente. Teniendo en cuenta este hecho, para nuestros cálculos podemos considerar que la escena 3D está compuesta por un número N de planos, con distribución de intensidad $I(\mathbf{x}; z_n)$. En tal caso, es posible discretizar la ecuación 7.4 y reescribirla como

$$I(\mathbf{x}) = \sum_{n=1}^N I(\mathbf{x}; z_n), \quad (7.5)$$

con

$$I(\mathbf{x}; z_n) = \frac{1}{M_{z_n}^2} O\left(\frac{\mathbf{x}}{M_{z_n}}, \frac{z_n}{M_{z_n}^2}\right) \otimes_2 h(\mathbf{x}; z_n). \quad (7.6)$$

En la Figura 65 se muestra de manera esquematizada el proceso de captura en un sistema de imagen integral de campo cercano, de acuerdo con las ecuaciones anteriores. A modo de ejemplo, se ha considerado que la escena 3D está compuesta por dos objetos planos ($N=2$), situados a diferentes profundidades. Esta diferencia en la posición axial de ambos objetos queda reflejada en los distintos períodos de la respuesta impulsional asociada a cada uno de ellos. Tal y como puede observarse en la figura, la imagen integral está compuesta por un conjunto de réplicas espacialmente equidistantes de ambos objetos.

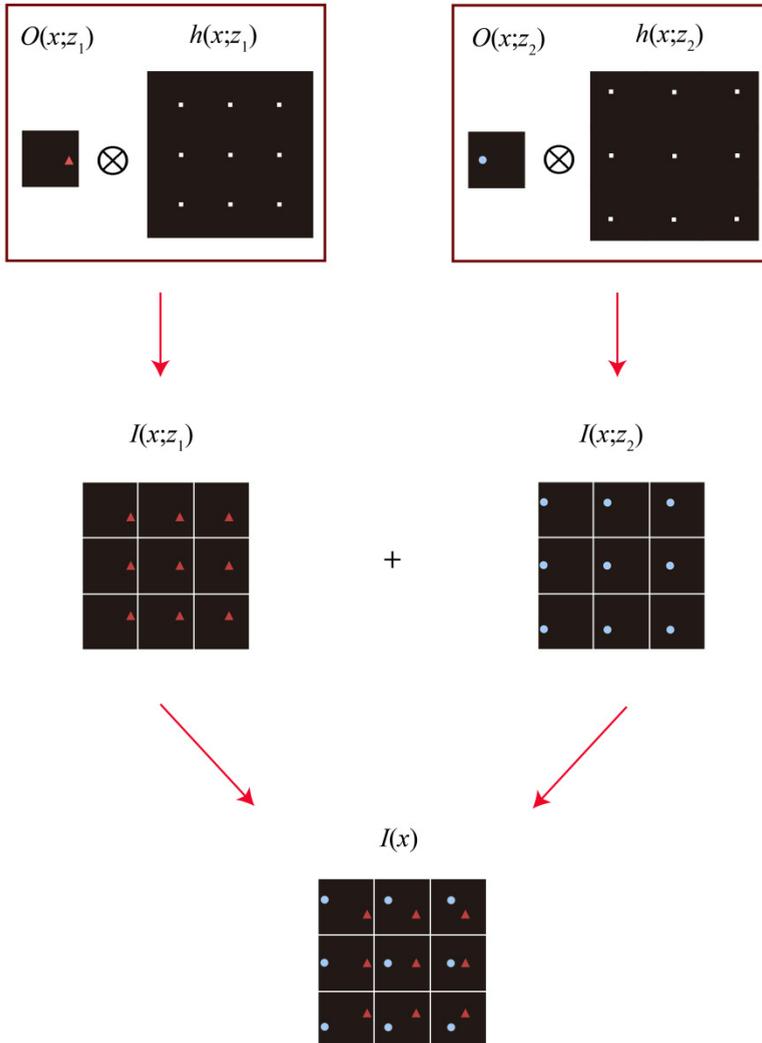


Figura 65. Esquema del proceso de captura en un sistema de imagen integral de campo cercano.

7.1.2. Algoritmo de reenfoque de la escena 3D a través de la desconvolución 2D de la imagen integral

De acuerdo con la ecuación 7.6, parece necesario llevar a cabo un proceso de desconvolución con la finalidad de recuperar la información de los diferentes planos que componen la escena tridimensional. Para ello, es conveniente trabajar en el dominio frecuencial, ya que de esta manera, el problema se simplifica notablemente.

El espectro de la imagen integral capturada por el sistema puede hallarse a través de la transformada de Fourier 2D de la ecuación 7.6 en combinación con la ecuación 7.5. De esta forma, se obtiene que

$$\tilde{I}(\mathbf{u}) = \sum_{n=1}^N \tilde{O}(M_{z_n} \mathbf{u}; \frac{z_n}{M_{z_n}^2}) \cdot H(\mathbf{u}; z_n), \quad (7.7)$$

donde $\mathbf{u} = (u, v)$ es un vector que representa las frecuencias espaciales transversales, y $H(\mathbf{u}; z_n)$ es la función de transferencia óptica 2D del sistema, también llamada OTF (del inglés, *optical transfer function*). Nótese que la OTF no es más que la transformada de Fourier de la respuesta impulsional para cada uno de los planos que componen la escena $H(\mathbf{u}; z_n) = F_{2D} \{h(\mathbf{x}; z_n)\}$.

Supongamos que se desea obtener la reconstrucción de la escena 3D en un plano situado a una cierta distancia z_q de la matriz de microlentes, siendo q el índice que define el plano de reconstrucción. Puesto que cada plano queda unívocamente definido por la periodicidad de la PSF, es posible generar computacionalmente la desconvolución 2D con un conjunto de OTFs correspondientes a diferentes períodos en el espacio imagen. Esta desconvolución 2D puede llevarse a cabo a través de un filtrado de Wiener¹⁸, de la manera siguiente:

¹⁸ El filtro de Wiener es muy utilizado en procesamiento de señales para eliminar el ruido presente en la señal registrada por el sistema.

$$\tilde{I}_{R_q}(\mathbf{u}) = \frac{\tilde{I}(\mathbf{u})\hat{H}^*(\mathbf{u}; z_q)}{\left|\hat{H}(\mathbf{u}; z_q)\right|^2 + w^2}, \quad (7.8)$$

donde * denota al complejo conjugado, w^2 es el parámetro de Wiener [101], y $\hat{H}(\mathbf{u}; z_q)$ hace referencia a la OTF asociada al plano de reconstrucción y generada computacionalmente. Bajo la consideración de que esta OTF generada computacionalmente representa, en buena aproximación, a la OTF real del sistema, entonces de las ecuaciones 7.7 y 7.8 se obtiene que

$$\tilde{I}_{R_q}(\mathbf{u}) = \tilde{O}\left(M_{z_q} \mathbf{u}; \frac{z_q}{M_{z_q}^2}\right) + \frac{\sum_{n \neq q}^N \tilde{O}\left(M_{z_n} \mathbf{u}; \frac{z_n}{M_{z_n}^2}\right) \cdot H(\mathbf{u}; z_n) \hat{H}^*(\mathbf{u}; z_q)}{\left|\hat{H}(\mathbf{u}; z_q)\right|^2 + w^2} \quad (7.9)$$

Nótese que para poder extraer la información adecuadamente, se ha considerado que las imágenes reconstruidas tienen una relación señal/ruido suficientemente elevada como para que el parámetro de Wiener satisfaga que

$$w^2 \ll \left|\hat{H}(\mathbf{u}; z_q)\right|^2. \quad (7.10)$$

Mediante la transformada de Fourier inversa de la ecuación 7.9 se obtiene

$$I_{R_q}(\mathbf{x}) = O\left(\frac{\mathbf{x}}{M_{z_q}}; \frac{z_q}{M_{z_q}^2}\right) + \sum_{n \neq q}^N O_{z_n}\left(\frac{\mathbf{x}}{M_{z_n}}; \frac{z_n}{M_{z_n}^2}\right) \otimes h_{def}(\mathbf{x}; z_q), \quad (7.11)$$

siendo $I_R(\mathbf{x})$ la distribución de intensidad de la reconstrucción.

De acuerdo con esta última ecuación, es importante destacar que la reconstrucción se compone de dos términos. El primer término contiene la información relativa al plano de reconstrucción situado a una distancia z_q de la matriz de microlentes. Dicho plano aparecerá perfectamente enfocado en la imagen final. Sin embargo, el segundo término de la ecuación 7.11 pone de manifiesto el hecho de que el método de reconstrucción carece de

seccionado óptico, de manera que el resto de planos que componen la escena tridimensional también van a estar presentes en la reconstrucción. Estos planos, para los cuales se cumple que $z_n \neq z_q$, son sumados con una periodicidad impuesta por la función de transferencia $\hat{H}(\mathbf{u}; z_q)$, creando así un efecto de desenfoque. Este desenfoque aparece reflejado en la ecuación como

$$h_{def}(\mathbf{x}; z_q) = F^{-1} \left(\frac{H(\mathbf{u}; z_n) \hat{H}^*(\mathbf{u}; z_q)}{|\hat{H}(\mathbf{u}; z_q)|^2 + w^2} \right). \quad (7.12)$$

7.1.3. Resultados experimentales

7.1.3.1. Reenfoco de la escena 3D a partir de la PSF no difractiva

Para mostrar la adecuación de nuestro método en la reconstrucción de escenas 3D en sistemas de imagen integral de campo cercano, se llevó a cabo el siguiente experimento de apertura sintética: se utilizó una cámara digital (Canon 450D, con un sensor tipo CMOS de 4272x2848 píxeles de 5.2 μm de tamaño, ensamblada con un objetivo EFS de focal variable 18-55 mm) para capturar diferentes perspectivas de una escena 3D compuesta por dos muñecos situados a diferentes profundidades. Para la captura de las distintas imágenes elementales la cámara se desplazó mecánicamente a lo largo de las direcciones transversales x e y . El desplazamiento total a lo largo de ambas direcciones fue de 50 mm. Los dos objetos se colocaron a una distancia de 320 y 350 mm respectivamente, delante de la cámara digital (ver Figura 66). Ambos objetos se situaron dentro de la profundidad de campo del sistema (ver ecuación 2.9) para obtener enfocada toda la escena tridimensional en las imágenes elementales.

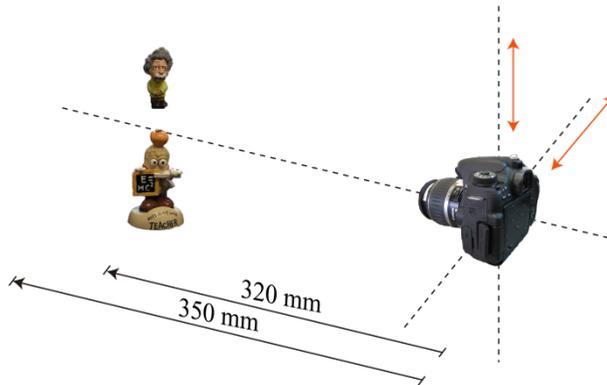


Figura 66. Esquema del montaje experimental para la captura de las distintas imágenes elementales que componen la imagen integral.

En la Figura 67(a) puede verse la imagen integral capturada mediante este sistema. En total se capturaron 11×11 imágenes elementales. Para reducir los tiempos de computación, se llevó a cabo un reescalado de la imagen integral, de manera que el número total de píxeles contenido dentro de cada una de las EIs fuese de 600×600 píxeles cada una. No obstante, para la aplicación del algoritmo de desconvolución únicamente se tuvo en cuenta el subconjunto de 3×3 imágenes elementales mostrado en la figura. Este subconjunto se extrajo de manera que la separación entre las nuevas imágenes elementales fuese lo más grande posible con el fin de obtener el máximo paralaje. Es importante mencionar que, si bien adquirir un elevado número de imágenes elementales permite obtener un mayor número de perspectivas de la escena, reducir el número de éstas no representa ningún inconveniente si lo que se pretende es realizar la reconstrucción en profundidad, como es el caso que se expone en este capítulo. No obstante, hay que tener presente que cuanto mayor sea el número de imágenes elementales implicadas en el proceso de reconstrucción, más suave será el emborronamiento de las regiones de la escena 3D que se encuentren fuera de foco en cada caso [102].

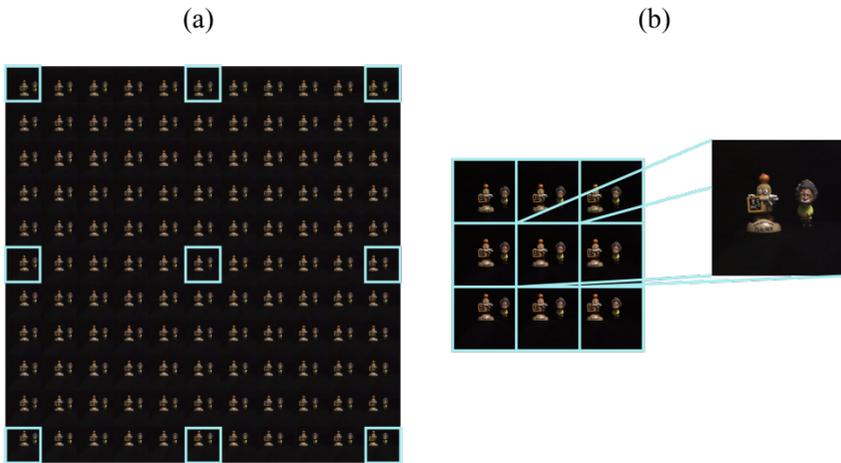


Figura 67. (a) Imagen integral obtenida experimentalmente. La imagen integral está compuesta por un total de 11×11 EIs. (b) Subconjunto de 3×3 EIs extraídas de (a) para la aplicación del algoritmo. Puede verse la vista central.

El algoritmo de reconstrucción propuesto fue implementado en Matlab© siguiendo el proceso detallado a continuación (ver Figura 68):

1. Creación del *array* de PSFs asociadas al sistema, de acuerdo con la ecuación 7.2. Cada respuesta impulsional es una matriz del mismo tamaño que la imagen integral capturada. El número total de PSFs que es posible generar queda determinado por el número de píxeles contenido en cada una de las imágenes elementales.
2. Aplicación de la función *transformada de Fourier rápida* (FFT) tanto de la imagen integral como de todas las PSFs.
3. Aplicación del algoritmo de desconvolución a través del filtro de Wiener dado por la ecuación 7.8.
4. Obtención del conjunto de imágenes correspondientes a los diferentes planos de foco, a través de las *transformadas de Fourier inversas*.

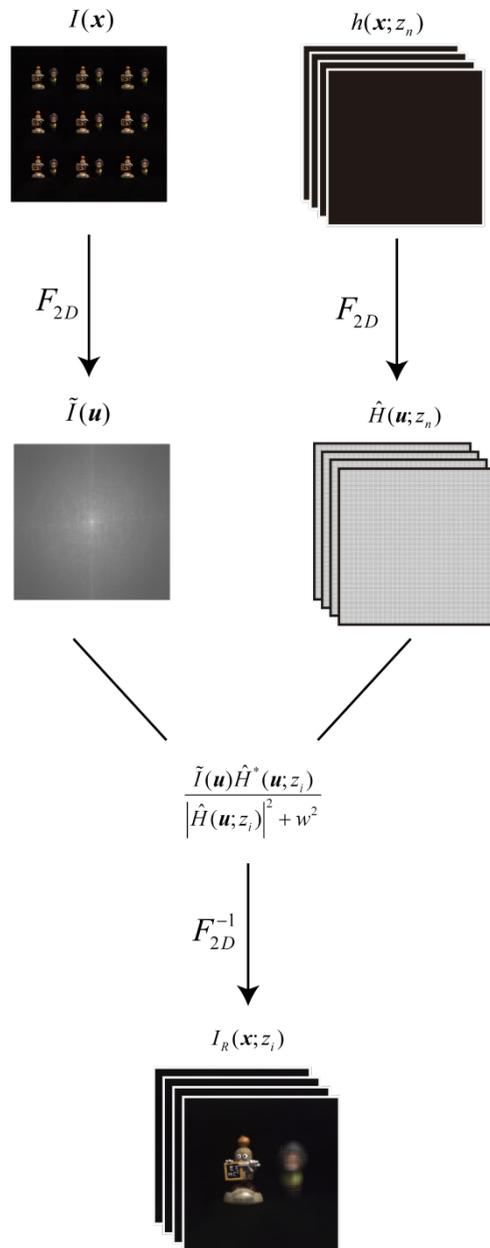


Figura 68. Esquema del algoritmo de reconstrucción basado en la desconvolución 2D.

En la Figura 69 se muestran dos planos diferentes de la escena obtenidos mediante el método propuesto.

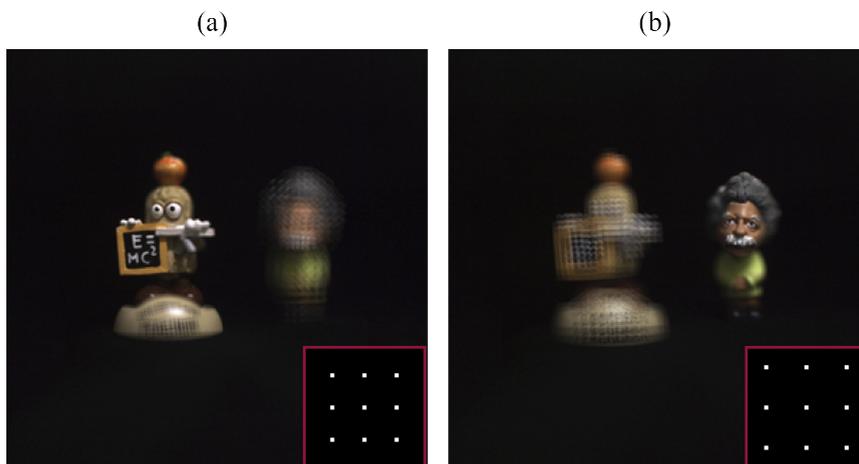


Figura 69. Reconstrucción en profundidad de la escena 3D tras aplicar el algoritmo de reconstrucción basado en la desconvolución 2D. La reconstrucción se llevó a cabo en los planos localizados a una distancia de (a) 320 mm y (b) 350 mm, con respecto al plano en el que se situó la cámara digital en el proceso de captura. La periodicidad de la PSF es de (a) 515 y (b) 523 píxeles.

Es importante destacar que este método de reconstrucción proporciona un conjunto de imágenes compuestas por un mismo número de píxeles, independientemente de la posición axial del plano de reconstrucción. El tamaño de las reconstrucciones es igual al tamaño de la imagen integral mostrada en la Figura 67 (b), aunque la información se encuentra contenida en una ventana de tamaño igual al tamaño de las imágenes elementales.

7.1.3.2. Resolución de las reconstrucciones obtenidas a través del algoritmo de desconvolución

De acuerdo con los resultados que se acaban de presentar, se ha podido constatar que la aplicación del algoritmo de reconstrucción basado en la desconvolución 2D permite recuperar la información en profundidad de una escena tridimensional. Para analizar la resolución espacial de las reconstrucciones en comparación con la resolución obtenida tras la

aplicación de los algoritmos convencionales, se llevó a cabo un segundo experimento, en el cual se realizó la captura de una imagen integral de un test USAF 1951. De la misma manera que en el experimento preliminar, se seleccionaron 3x3 EIs de la imagen integral original. El desplazamiento total de la cámara fue de 44 mm a lo largo de las dos direcciones transversales x e y . El objeto se encontraba situado a una distancia de 300 mm de la cámara digital utilizada para registrar las imágenes.

En la Figura 70 se muestra la reconstrucción del objeto test obtenida por desconvolución así como por solapamiento de los píxeles de las imágenes elementales. Tal y como puede observarse, en ambos casos la resolución viene dada por el Elemento 3 del Grupo 0. De esta forma, es posible establecer que el método propuesto para la reconstrucción de la escena 3D no deteriora la resolución de la misma, en comparación con el método tradicional.

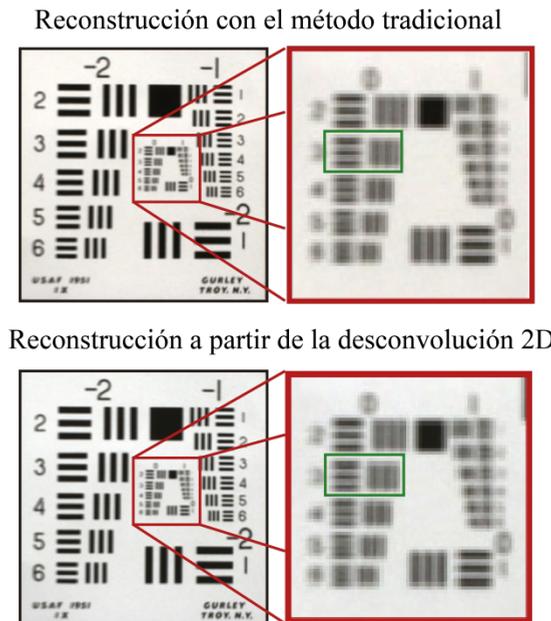


Figura 70. Resolución espacial de la reconstrucción en profundidad obtenida a través del algoritmo basado en la desconvolución así como del algoritmo tradicional de solapamiento de píxeles.

7.1.3.3. Reconstrucciones alternativas a partir de la desconvolución 2D con una PSF sintética

Tal y como se ha visto en las secciones anteriores, el método propuesto para obtener la reconstrucción en profundidad correspondiente a una escena 3D lleva a cabo un proceso inverso de desconvolución a través de un filtro de Wiener, el cual actúa en el dominio de Fourier. A diferencia de la mayoría de los algoritmos tradicionales, este hecho abre un abanico de posibilidades en el campo del procesamiento digital en imagen integral.

7.1.3.3.1. Reconstrucción simultánea de diferentes planos de la escena

Cuando se realiza la reconstrucción en profundidad de una cierta escena tridimensional, típicamente se selecciona el plano de interés, y se lleva a cabo el correspondiente algoritmo de reconstrucción. De esta forma, de acuerdo con la ecuación 5.11, únicamente aquellos puntos del espacio objeto cuya periodicidad en la imagen integral coincida con la periodicidad de la PSF asociada al plano de interés se verán enfocados en la reconstrucción.

Supóngase que se desea obtener una imagen con un mayor número de planos enfocados simultáneamente. Puesto que la posición axial z_n de cada uno de los planos queda determinada por el valor de la periodicidad $p(z_n)$ de su respuesta impulsional asociada $h(\mathbf{x}; z_n)$, es posible componer una nueva PSF sintética como

$$h_{\text{simt}}(\mathbf{x}; z_{i,j,\dots}) = h(\mathbf{x}; z_i) + h(\mathbf{x}; z_j) + \dots, \quad (7.12)$$

donde las PSFs individuales $h(\mathbf{x}; z_i)$ y $h(\mathbf{x}; z_j)$ vienen dadas por la ecuación 5.2. De esta forma, la PSF sintética $h_{\text{simt}}(\mathbf{x}; z_{i,j,\dots})$ contendrá información de todos los planos en los cuales se desee obtener la reconstrucción. La desconvolución de la imagen integral registrada en el sensor con esta PSF sintética proporcionará la reconstrucción de la escena con tantos planos enfocados como PSFs hayan contribuido a la creación de la PSF sintética. La reconstrucción se lleva a cabo, de nuevo, a través de un filtrado de Wiener

$$\tilde{I}_R(\mathbf{u}) = \frac{\tilde{I}(\mathbf{u})\hat{H}_{sint}^*(\mathbf{u}; z_{i,j}, \dots)}{\left|\hat{H}_{sint}(\mathbf{u}; z_{i,j}, \dots)\right|^2 + w^2}. \quad (7.13)$$

A partir de la imagen integral capturada experimentalmente (ver Figura 67), se llevó a cabo la reconstrucción mostrada en la Figura 71. Tal y como puede observarse en la Figura 71, en ambos casos la PSF sintética se obtuvo como la suma de dos PSFs individuales, con periodicidades asociadas de 510 y 523 píxeles para el caso (a), y de 517 y 525 píxeles para el caso (b). Como resultado, es posible ver que en la Figura 71(a) aparecen enfocados simultáneamente la palabra “Teacher” de la base del objeto más cercano así como el bigote del muñeco situado en una posición más alejado de la cámara digital empleada en el proceso de captura. De la misma manera, en la Figura 38 (b) tanto la manzana del primer objeto como el codo del segundo muñeco se encuentran ambos enfocados.

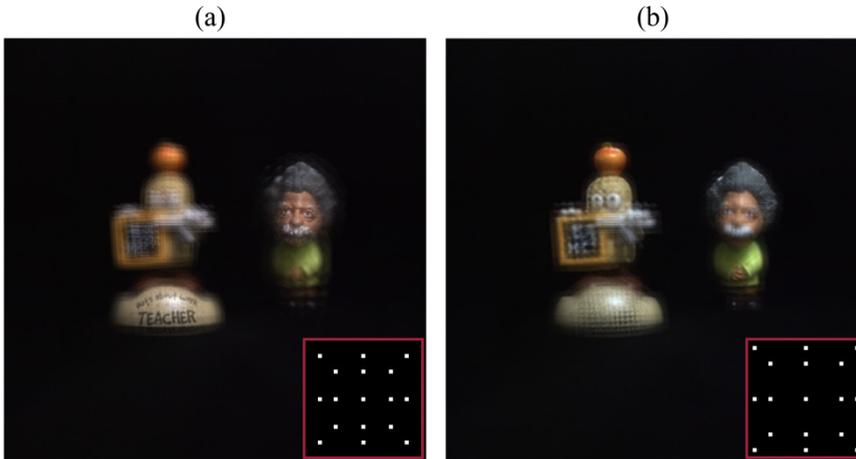


Figura 71. Reconstrucción a partir de la imagen integral capturada experimentalmente (Figura 26). En ambos casos se consigue un enfoque simultáneo de diferentes planos a través de la desconvolución de la imagen integral con una PSF sintética resultado de sumar las PSF individuales asociadas a cada plano.

7.1.3.3.2. Aumento de la profundidad de campo de las reconstrucciones

Considerando una PSF sintética más compleja, es posible aumentar la profundidad de campo de las reconstrucciones a voluntad, únicamente limitada por la profundidad de campo impuesta por el objetivo fotográfico. En este caso, la suma de diferentes PSFs asociadas a planos consecutivos en el espacio objeto proporcionará una PSF sintética dada por

$$h_{sint}(\mathbf{x}; \Delta z_n) = \sum_i^{i+(N-1)} h(\mathbf{x}; z_i), \quad (7.13)$$

donde N hace referencia al número de planos (consecutivos) que determinan la nueva profundidad de campo de la reconstrucción, Δz_n .

En la siguiente figura puede verse el resultado de aplicar el algoritmo de desconvolución con una respuesta impulsional sintética compuesta por tres (Figura 72(a)) y siete (Figura 72(b)) PSFs individuales. Mientras que en la Figura 72(a) aparece enfocado el objeto más cercano, en la Figura 72(b) es toda la escena 3D la que aparece en foco simultáneamente. El rango de variación de las distintas PSFs es de 510 hasta 518 píxeles para el caso (a), y de 510 a 526 píxeles en el caso (b).

De esta forma, la aplicación del algoritmo de desconvolución haciendo uso de una PSF sintética permite ampliar las posibilidades de la reconstrucción computacional, siendo posible enfocar simultáneamente diferentes planos de la escena, o incluso extender la profundidad de campo de las imágenes reconstruidas, en una cierta extensión axial, tal y como acabamos de ver.

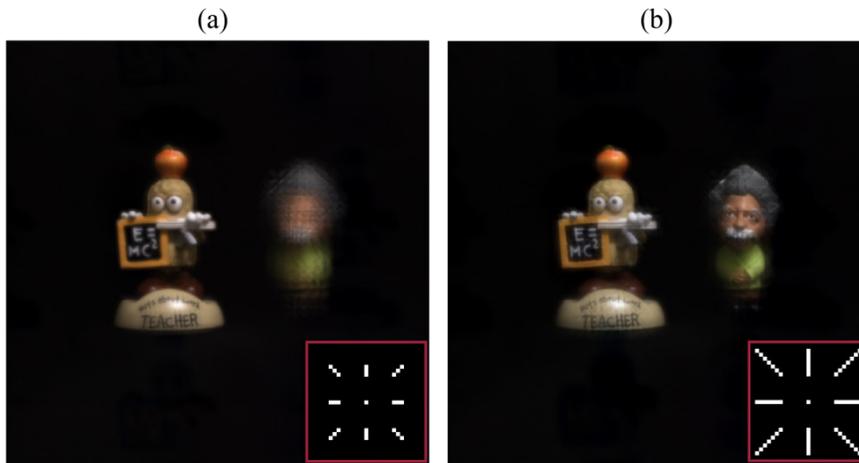


Figura 72. Aumento de la profundidad de campo de las reconstrucciones obtenidas a través del algoritmo de desconvolución.

7.2. Reconstrucción en un sistema de imagen integral de campo lejano

De acuerdo con lo expuesto en la sección 5.1.1., la aplicación del algoritmo de desconvolución propuesto para llevar a cabo la reconstrucción de escenas tridimensionales se limita a la región del espacio objeto para la cual el sistema puede ser considerado como un sistema 2D-LSI. Cuando se dispone de una imagen integral capturada mediante un sistema de imagen integral de campo lejano, la imagen intermedia de la escena se sitúa en las inmediaciones de la matriz de microlentes gracias al efecto de la lente de campo insertada en el sistema. De esta forma, es posible afirmar que los sistemas de imagen integral de campo lejano no son, en general, sistemas invariantes a desplazamientos, puesto que un pequeño desplazamiento lateral del objeto, da lugar a un cambio en las microlentes sobre las que inciden los rayos emitidos por el mismo. En consecuencia, no es posible expresar la distribución de irradiancia $I(x)$ de la imagen integral como la convolución de la ecuación 5.6. Sin embargo, debido a la relación de transposición existente entre los sistemas de imagen integral de campo lejano y los

sistemas de imagen integral de campo cercano (véase capítulo 2), siempre es posible obtener una imagen integral equivalente, de manera que se satisfaga el principio de linealidad e invariancia a desplazamientos.

La Figura 73 (a) muestra una imagen integral registrada a través del microscopio de Imagen Integral descrito en el capítulo 3 (objetivo $20x$, $NA = 0.4$, lente de tubo $f_{LT} = 200$ mm y MLA de período $p = 110$ μm y $NA_{ML} = 0.01$). La imagen consta de 72×72 microimágenes, con 27×27 píxeles cada una.

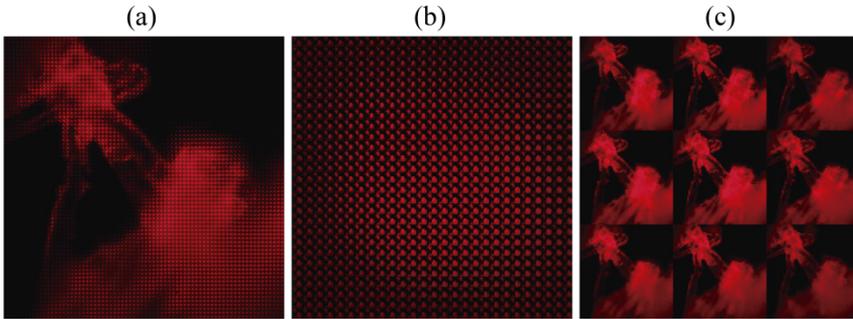


Figura 73 (a) Imagen Integral capturada con un IMic. La imagen consta de 72×72 microimágenes, con 27×27 píxeles cada una. (b) Subimágenes obtenidas a partir de la imagen integral capturada. (c) Subconjunto de 3×3 EIs extraído a partir de (b).

Tras aplicar el correspondiente algoritmo de transposición, se obtuvo la imagen de la Figura 73 (b), compuesta por 27×27 subimágenes, con 72×72 píxeles cada una. Tal y como se expuso en la sección 5.1.3.1, la reconstrucción en profundidad a través del algoritmo de desconvolución consume un menor tiempo de cálculo, con idénticos resultados en cuanto a la nitidez de los planos en foco, si se selecciona un subconjunto de vistas de la imagen integral. Concretamente, se aplicó el algoritmo de reconstrucción al subconjunto de 3×3 subimágenes mostrado en la Figura 73 (c). A partir de este subconjunto, se calcularon las correspondientes PSFs asociadas a los distintos planos. La operación de desconvolución a través del filtrado de Wiener, dio como resultado la reconstrucción que se muestra en la Figura 74, donde es posible distinguir dos planos distintos de la muestra 3D.



Figura 74. Reconstrucción en profundidad a través del algoritmo de desconvolución de una escena 3D capturada con un IMic.

Podemos concluir, por tanto, que el algoritmo de reconstrucción basado en la desconvolución 2D es válido también para la reconstrucción de escenas registradas mediante sistemas de captura de imagen integral de campo lejano. Las posibilidades en cuanto a reconstrucción se refiere resultan especialmente interesantes en microscopía integral, donde, tal y como se vio en el capítulo 5, el sistema presenta una escasa profundidad de campo y donde, por tanto, la aplicación del algoritmo haciendo uso de una respuesta impulsional sintética resultaría particularmente interesante.

Capítulo 8

Conclusiones

En la actualidad, son muchos los campos de la Ciencia que precisan de sofisticados sistemas de adquisición de imágenes, capaces de preservar la información espacial y angular de objetos con extensión axial. Una de las técnicas con la que es posible registrar esta información tridimensional y que más desarrollo ha experimentado en los últimos años es la Imagen Integral. En el desarrollo de esta Tesis, se han analizado los principios básicos de la técnica, tanto para el caso de los sistemas de captura de imagen integral de campo lejano, como en los de captura de campo cercano. El procesado de la información registrada mediante un sistema de captura de imagen integral, en cualquiera de sus variantes, permite realizar una reconstrucción computacional en profundidad de la escena 3D, así como obtener un conjunto de perspectivas diferentes de la misma.

Una de las aplicaciones más interesantes de la tecnología de imagen integral es la de su adaptación al campo de la microscopía. En este trabajo, hemos presentado las características más relevantes de un microscopio de imagen integral así como sus principales inconvenientes. Aunque los resultados obtenidos son bastante prometedores, es importante destacar que en este ámbito, sin embargo, la técnica presenta una serie de peculiaridades. Así, mientras que algunos de los inconvenientes están directamente relacionados con los efectos difractivos que tienen lugar en un microscopio, otros se deben a limitaciones propias de la técnica de imagen integral.

La principal limitación de la microscopía de imagen integral es la pobre resolución espacial de las reconstrucciones, en comparación con las

imágenes proporcionadas por un microscopio convencional. Esta resolución espacial está determinada fundamentalmente por el tamaño de las microlentes presentes en la matriz. Para reducir el límite de resolución, se ha propuesto un método basado en un proceso de doble captura para aumentar los puntos de muestreo del objeto. La captura secuencial de dos mapas de radiancia debidamente desplazados y posteriormente entrelazados, permite incrementar la frecuencia de muestreo sin aumentar los efectos difractivos. Para desplazar los rayos luminosos que inciden sobre las microlentes se propuso la inserción de una lámina plano-paralela entre la lente de tubo y la matriz de microlentes de un microscopio integral.

Otro de los inconvenientes presentes en la técnica es la pequeña profundidad de campo del sistema, la cual se encuentra fundamentalmente limitada por la difracción. En consecuencia, la región de la escena 3D cuya información puede ser recuperada mediante el algoritmo de reconstrucción se encuentra restringida a aquellas zonas de la misma que son registradas de manera nítida por las microlentes. Para solucionar este problema, se ha propuesto un método basado en la combinación de las reconstrucciones asociadas a múltiples capturas, correspondientes cada una de ellas a un plano de referencia objeto distinto. Para ello, se ha insertado una lente líquida en el plano de la pupila de salida de un objetivo de microscopio, con el fin de producir un desplazamiento en la posición axial del plano principal objeto del sistema equivalente. La captura de tres imágenes integrales obtenidas mediante este procedimiento ha permitido combinar las reconstrucciones asociadas a cada una de ellas, aumentando así la profundidad de campo efectiva del sistema.

Aprovechando la relación de transposición existente entre los sistemas de imagen integral de campo cercano y los sistemas de imagen integral de campo lejano, se ha propuesto la implementación de un microscopio integral de Fourier. La configuración de este microscopio es sustancialmente distinta a la del microscopio integral tradicional, pues se incorpora una matriz de microlentes en el plano de la pupila de salida del objetivo de microscopio. Este nuevo diseño proporciona un doble beneficio en relación a las limitaciones mencionadas en los párrafos anteriores, pues permite aumentar

simultáneamente la resolución lateral de las reconstrucciones, así como su profundidad de campo.

Finalmente, se ha desarrollado un nuevo algoritmo que proporciona la reconstrucción en profundidad de escenas 3D, en el contexto de un sistema de captura de imagen integral. El algoritmo lleva a cabo un proceso de desconvolución de la imagen integral con la respuesta impulsional no difractiva asociada a la captura. Este método, que puede aplicarse tanto a las capturas realizadas con un sistema de imagen integral de campo cercano como con uno de campo lejano, permite además obtener reconstrucciones no convencionales al emplear una PSF sintética en el proceso de desconvolución. De esta forma, es posible reconstruir la escena seleccionando activamente diferentes planos de foco no consecutivos de la misma, o bien aumentar la profundidad de campo del sistema.

Anexo 1

Desplazamiento lateral de los rayos luminosos al atravesar una lámina plano-paralela

Considérese un rayo luminoso que incide con un cierto ángulo θ_1 sobre una lámina plano-paralela de índice de refracción n y espesor ℓ (ver Figura 75 (a)). Dicho rayo puede ser parametrizado a través de las coordenadas (x_1, θ_1) . Es posible obtener las nuevas coordenadas del rayo (x'_1, θ'_1) a la salida de la lámina, a partir de la matriz de transferencia del sistema

$$A = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & n \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -\ell \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1/n \end{pmatrix}. \quad (\text{A1.1})$$

De esta forma, se obtiene que:

$$\begin{pmatrix} x'_1 \\ \theta'_1 \end{pmatrix} = A \begin{pmatrix} x_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -\ell/n \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1 - \theta_1 \ell/n \\ \theta_1 \end{pmatrix}. \quad (\text{A1.2})$$

De la ecuación anterior se concluye que el rayo luminoso que atraviesa la lámina no modifica su inclinación, puesto que $\theta'_1 = \theta_1$, mientras que sufre un desplazamiento con respecto a la posición x''_1 que tendría de no existir la lámina plano-paralela, es decir si sólo se considerase una traslación una distancia igual al espesor de la lámina ℓ :

$$\begin{pmatrix} x''_1 \\ \theta''_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -\ell \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1 - \ell\theta_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix}. \quad (\text{A1.3})$$

El desplazamiento $d_1 = x'_1 - x''_1$, puede obtenerse por tanto, como:

$$d_1 = \ell \theta_1 \left(\frac{n-1}{n} \right). \quad (\text{A1.4})$$

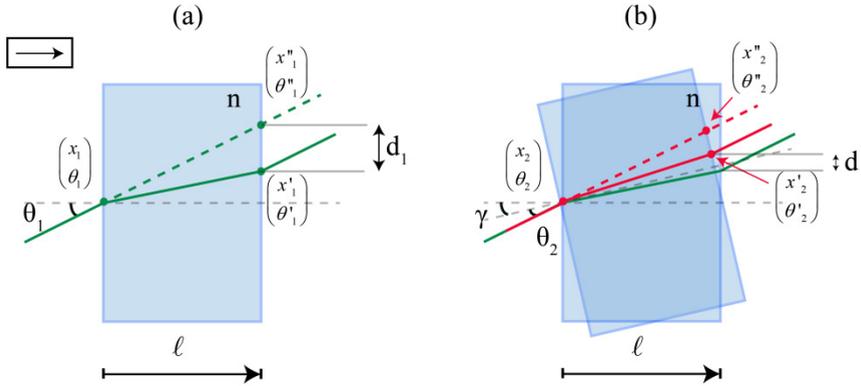


Figura 75. (a) Desplazamiento de los rayos luminosos al atravesar una lámina plano-paralela. (b) Desplazamiento total como consecuencia de girar la lámina un cierto ángulo γ .

Supóngase ahora que la lámina plano-paralela sufre una cierta rotación tal y como se muestra en la Figura 75 (b), siendo γ el ángulo de giro con respecto al eje transversal. El mismo rayo que en el caso anterior incidía con un ángulo θ_1 , ahora lo hará con un ángulo θ_2 con respecto a la nueva normal. De la ecuación A1.4 se deduce que:

$$d_2 = \ell \theta_2 \left(\frac{n-1}{n} \right). \quad (\text{A1.5})$$

Así, el desplazamiento total sufrido por el rayo luminoso como consecuencia del giro de la lámina, puede obtenerse como

$$d = d_1 - d_2 = \ell(\theta_1 - \theta_2) \left(\frac{n-1}{n} \right) = \ell \gamma \left(\frac{n-1}{n} \right). \quad (\text{A1.6})$$

La expresión dada por la ecuación A1.6 es válida para todos los rayos luminosos independientemente de su ángulo de incidencia. De esta forma, el

desplazamiento sufrido por todos los rayos luminosos que atraviesan el sistema queda perfectamente definido por el valor del ángulo γ de rotación de la lámina plano-paralela.

Desplazamiento axial del plano imagen al insertar una lámina plano-paralela

Otra de las consecuencias de la inserción de una lámina plano-paralela en un determinado sistema óptico puede verse reflejada en la Figura 76 (a). Debido al desplazamiento lateral sufrido por los rayos luminosos como consecuencia de las diferentes transformaciones que tienen lugar en la lámina, el punto de convergencia de dichos rayos se va a ver también desplazado una cierta cantidad $\Delta z'$. Bajo aproximación paraxial, es inmediato ver que (Figura 76 (b)):

$$\theta_1 = \frac{d_1}{\Delta z'}, \quad (\text{A1.7})$$

y, de acuerdo a la ecuación A1.4:

$$\Delta z' = \ell \left(\frac{n-1}{n} \right), \quad (\text{A1.8})$$

ecuación que es válida para todos los rayos luminosos, ya que no depende del ángulo de incidencia.

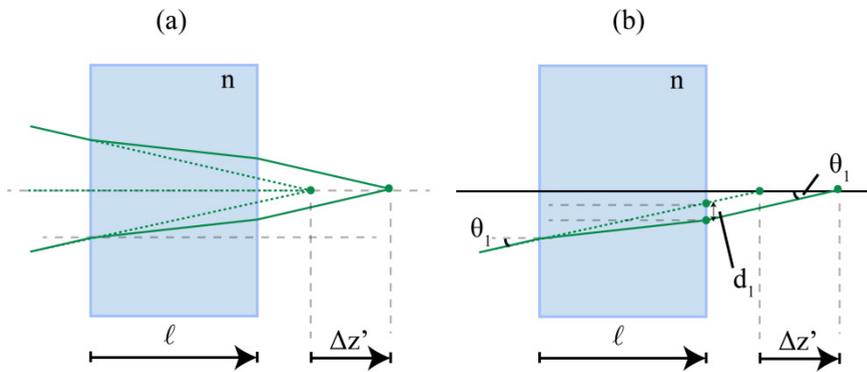


Figura 76. (a) Desplamiento axial del plano imagen como consecuencia de insertar una lámina plano-paralela. (b) El desplazamiento axial $\Delta z'$ es independiente del ángulo de incidencia.

Anexo 2

Valores de resolución en un test USAF 1951

En un test USAF, la resolución expresada en términos de la frecuencia de corte, viene dada por la expresión

$$v_c (mm^{-1}) = 2^{Grupo+(Elemento-1)/6} \quad (A2.1)$$

A partir de la ecuación anterior, es posible obtener la siguiente tabla:

		Elemento					
		1	2	3	4	5	6
Grupo	-2	0.250	0.281	0.315	0.354	0.397	0.445
	-1	0.500	0.561	0.630	0.707	0.794	0.891
	0	1.00	1.12	1.26	1.41	1.59	1.78
	1	2.00	2.24	2.52	2.83	3.17	3.56
	2	4.00	4.49	5.04	5.66	6.35	7.13
	3	8.00	8.98	10.08	11.31	12.70	14.25
	4	16.00	17.96	20.16	22.63	25.40	28.51
	5	32.0	35.9	40.3	45.3	50.8	57.0
	6	64.0	71.8	80.6	90.5	101.6	114.0
	7	128.0	143.7	161.3	181.0	203.2	228.1
	8	256.0	287.4	322.5	362.0	406.4	456.1
9	512.0	574.7	645.1	724.1	812.7	912.3	

Tabla 4. Resolución en términos de la frecuencia de corte $v_c (mm^{-1})$ en un test USAF 1951.

Teniendo en cuenta que la resolución espacial puede calcularse como la inversa de la frecuencia de corte, resulta útil obtener una nueva tabla:

		Elemento					
		1	2	3	4	5	6
Grupo	-2	4000.0	3563.6	3174.8	2828.4	2519.8	2244.9
	-1	2000.0	1781.8	1587.4	1414.2	1259.9	1122.5
	0	1000.0	890.9	793.7	707.1	630.0	561.2
	1	500.0	445.4	396.9	353.6	315.0	280.6
	2	250.0	222.7	198.4	176.8	157.5	140.3
	3	125.0	111.4	99.2	88.4	78.7	70.2
	4	62.5	55.7	49.6	44.2	39.4	35.1
	5	31.3	27.8	24.8	22.1	19.7	17.5
	6	15.6	13.9	12.4	11.0	9.8	8.8
	7	7.8	7.0	6.2	5.5	4.9	4.4
	8	3.9	3.5	3.1	2.8	2.5	2.2
9	2.0	1.7	1.6	1.4	1.2	1.1	

Tabla 5. Resolución espacial $\rho(\mu\text{m})$ en un test USAF 1951, obtenida como la inversa de la frecuencia de corte.

Bibliografía

- [1] I. P. Howard, and B. J. Rogers, *Binocular vision and stereopsis* (Oxford University Press, 1995).
- [2] C. Wheatstone, “Contributions to the Physiology of Vision.—Part the First. On Some Remarkable and Hitherto Unobserved, Phenomena of Binocular Vision”, *Philos. T. R. Soc. Lond.* **128**, 371-394 (1838).
- [3] D. Brewster, *The Stereoscope; Its History, Theory and Construction, with Its Application to the Fine and Useful Arts and to Education* (John Murray, 1856).
- [4] N. J. Wade, and H. Ono, “The stereoscopic views of Wheatstone and Brewster”, *Psychol. Res.* **47**, 125-133 (1985).
- [5] W. Rollmann, “Notiz zur Stereoskopie”, *Ann. Phys.* **165**, 350-351 (1853).
- [6] F. L. Kooi, and A. Toet, “Visual comfort of binocular and 3D displays”, *Displays* **25**, 99-108 (2004).
- [7] E. H. Land, “Polarizing optical system”, U. S. Patent 2,099,694 (1937).
- [8] W. Hess, “Stereoscopic picture”, U. S. Patent 1,128,979 (1915).
- [9] A. Berthier, “Images stéréoscopiques de grand format”, *Cosmos* **34**, 205-210 (1896).
- [10] F. E. Ives, “A novel stereogram,” *J. Frankl. Inst.* **153**, 51-52 (1902).
- [11] F. Ives, “Parallax stereogram and process of making same”, U.S. Patent 725,567 (1903).
- [12] G. Lippmann, “Epreuves reversibles donnant la sensation du relief”, *J. Phys.* **7**, 821-825 (1908).
- [13] G. Lippmann, *J. Soc. Franc. Phys* **69** (1912).
- [14] G. Lippmann, “L'étalon international de radium,” *Radium* **9**, 169-170 (1912).
- [15] C. B. Burckhardt, “Optimum parameters and resolution limitation of Integral Photography”, *J. Opt. Soc. Am.* **58**, 71-76 (1968).
- [16] A. P. Sokolov, *Autostereoscopy and Integral Photography by Professor Lippmann's Method*, (Moscow State Univ. Press, 1911).
- [17] H. E. Ives, “Optical Properties of a Lippmann Lenticulated Sheet”, *J. Opt. Soc. Am.* **21**, 171-176 (1931).
- [18] D. F. Coffey, “Apparatus for Making a Composite Stereograph”, U.S. Patent 2,063,985 (1936).
- [19] H. Navarro, A. Dorado, G. Saavedra, and M. Martínez-Corral, “Three-Dimensional Imaging and Display through Integral Photography”, *J. Inf. Commun. Converg. Eng.* **12**, 89-96 (2014).
- [20] E. H. Adelson, and J. Y. A. Wang, “Single lens stereo with plenoptic camera,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **14**, 99-106 (1992).

- [21] J. Arai, F. Okano, H. Hoshino, and I. Yuyama, "Gradient-index lens-array method based on real-time integral photography for three-dimensional images," *Appl. Opt.* **37**, 2034-2045 (1998).
- [22] J. S Jang, and B. Javidi, "Improved viewing resolution of three-dimensional integral imaging by use of nonstationary micro-optics," *Opt. Lett.* **27**, 324-326 (2002).
- [23] S. Jung, J. H. Park, H. Choi, and B. Lee, "Viewing-angle-enhanced integral three-dimensional imaging along all directions without mechanical movement", *Opt. Express* **12**, 1346-1356 (2003).
- [24] P. Latorre-Carmona, E. Sánchez-Ortiga, X. Xiao, F. Pla, M. Martínez-Corral, H. Navarro, G. Saavedra, and B. Javidi, "Multispectral integral imaging acquisition and processing using a monochrome camera and a liquid crystal tunable filter", *Opt. Express* **20**, 25960-25969 (2012).
- [25] A. Carnicer, and B. Javidi, "Polarimetric 3D Integral Imaging in Photon-Starved Conditions", *Opt. Express* **23**, 6408-6417 (2015).
- [26] X. Xiao, B. Javidi, M. Martínez-Corral, and A. Stern, "Advances in three-dimensional integral imaging: sensing, display, and applications", *Appl. Opt.* **52**, 540-560 (2013).
- [27] Y. Zhao, X. Xiao, M. Cho, and B. Javidi, "Tracking of multiple objects in unknown background using Bayesian estimation in 3D space", *J. Opt. Soc. Am. A* **28**, 1935-1940 (2011).
- [28] K. Lynch, T. Fahringer y B. Thurow, "Three-dimensional particle image velocimetry using a plenoptic camera", *AIAA* **1056**, 1-14 (2012).
- [29] X. Xiao, B. Javidi, G. Saavedra, M. Eismann, and M. Martínez-Corral, "Three-dimensional polarimetric computational integral imaging", *Opt. Express* **20**, 15481-15488 (2012).
- [30] L. F. Rodríguez-Ramos, I. Montilla, J. J. Fernández-Valdivia, J. L. Trujillo-Sevilla, and J. M. Rodríguez-Ramos, "Concepts, laboratory and telescope test results of the plenoptic camera as a wavefront sensor", *Proc. SPIE* **8447**, 844745 (2012).
- [31] T. Okoshi, "Three-dimensional displays", *Proc. IEEE* **68**, 548-564 (1980).
- [32] F. Okano, H. Hoshino, J. Arai, and I. Yayuma, "Real time pickup method for a three-dimensional image based on integral photography," *Appl. Opt.* **36**, 1598-1603 (1997).
- [33] A. Stern, Y. Yitzhaky, and B. Javidi, "Perceivable light fields: Matching the requirements between the human visual system and autostereoscopic 3-D displays", *Proc. IEEE* **102**, 1571-1585 (2014).
- [34] H. Arimoto, and B. Javidi, "Integral 3D imaging with digital reconstruction," *Opt. Lett.* **26**, 157-159 (2001).
- [35] S. H Hong, J. S. Jang, and B. Javidi, "Three-dimensional volumetric object reconstruction using computational integral imaging", *Opt. Express* **12**, 483-491 (2004).

- [36] Y. S. Hwang, and E. S. Kim, “Perspective-variant reconstruction of a three-dimensional object along the depth direction with virtually generated elemental images by ray-based pixel mapping in integral-imaging”, *Opt. Lasers Eng.* **51**, 797–807 (2013).
- [37] L. McMillan y G. Bishop, “Plenoptic modeling: an image-based rendering system”, *Proc. ACM SIGGRAPH Conf. on Comp. Graphics*, 39-46 (1995).
- [38] J. X. Chai, X. Tong, S. C. Chan y H. Y. Shun, “Plenoptic sampling”, *Proc. ACM SIGGRAPH Conf. on Comp. Graphics*, 307-318 (2000).
- [39] S. Kishk, and B. Javidi, “Improved resolution 3D object sensing and recognition using time multiplexed computational integral imaging”, *Opt. Express* **11**, 3528-3541 (2003).
- [40] J. H. Park, S. Jung, H. Choi, Y. Kim, and B. Lee, “Depth extraction by use of rectangular lens array and one-dimensional elemental image modification”, *Appl. Opt.* **43**, 4882-4895 (2004).
- [41] G. Saavedra, R. Martínez-Cuenca, M. Martínez-Corral, H. Navarro, M. Daneshpanah, and B. Javidi, “Digital slicing of 3D scenes by Fourier filtering of integral images”, *Op. Express* **16**, 17154-17160 (2008).
- [42] M. Cho, and B. Javidi, “Three-dimensional visualization of objects in turbid water using integral imaging”, *J. Disp. Technol.* **6**, 544-547 (2010).
- [43] M. Levoy, R. Ng, A. Adams, M. Footer, and M. Horowitz, “Light field microscopy,” *ACM Trans. Graph.* **25**, 924–934 (2006).
- [44] E. Cuhe, P. Marquet, and C. Depeursinge, “Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms,” *Appl. Opt.* **38**, 6994–7001 (1999).
- [45] E. Sánchez-Ortiga, A. Doblas, G. Saavedra, M. Martínez-Corral, and J. Garcia-Sucerquia, “Off-axis digital holographic microscopy: practical design parameters for operating at diffraction limit”, *Appl. Opt.* **53**, 2058–2066 (2014).
- [46] S. R. P. Pavani, and R. Piestun, “Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system”, *Opt. Express* **16**, 22048–22057 (2008).
- [47] S. Abrahamsson, J. Chen, B. Hajj, S. Stallinga, A. Y. Katsov, J. Wisniewski, G. Mizuguchi, P. Soule, F. Mueller, C. Dugast Darzacq, X. Darzacq, C. Wu, C. I. Bargmann, D. A. Agard, M. Dahan, and M. G. L. Gustafsson, “Fast multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy,” *Nat. Methods* **10**, 60–63 (2012).
- [48] E Hecht, *Optics* (Addison-Wesley, 2012).
- [49] E. H. Adelson y J. R. Bergen, “The plenoptic function and the elements of early vision,” *Computational models of visual processing* **1**, 3-20 (1991).
- [50] M. Levoy y P. Hanrahan, “Light Field Rendering”, *Proc. SIGGRAPH, ACM*, 31-42 (1996).

- [51] T. Georgiev, and A. Lumsdaine, “The focused plenoptic camera and rendering”, *J. Electron. Imaging* **19**, 021106 (2010).
- [52] A. Gershun, “The light field”, *Stud. Appl. Math.* **18**, 51-151 (1939).
- [53] Martínez Corral, W. Furlan, A. Pons y G. Saavedra, *Instrumentos Ópticos y Optométricos: Teoría y Prácticas*, (Universitat de València, 1998).
- [54] M. Levoy, “Light fields and computational imaging”, *Computer* **39**, 46-55 (2006).
- [55] K. Halbach, “Matrix representation of Gaussian optics”, *Am. J. Phys.* **32**, 90-108 (1964).
- [56] B. Wilburn, N. Joshi, V. Va ish, E. V. Talvala, E. Antunez, A. Barth, A. Adams, M. Horowitz, and M. Levoy, “High Performance Imaging Using Large Camera Arrays” *Proc. ACM SIGGRAPH* **24**, 765-776 (2005).
- [57] J. S. Jang, and B. Javidi, “Three-dimensional synthetic aperture integral imaging”, *Opt. Lett.* **27**, 1144-1146 (2002).
- [58] Y. S. Hwang, S.-H. Hong, and B. Javidi "Free View 3' D Visualization of Occluded Objects by Using Computational Synthetic Aperture Integral Imaging", *J. Disp. Technol.* **3**, 64-70 (2007).
- [59] H. Navarro, J. C. Barreiro, G. Saavedra, M. Martínez-Corral and B. Javidi, “High-resolution far-field integral-imaging camera by double snapshot”, *Opt. Express* **20**, 890-895 (2012).
- [60] H. Navarro, M. Martinez-Corral, A. Dorado, G. Saavedra, A. Llavador, and B. Javidi, “Capture of the spatio-angular information of a 3D scene”, *Opt. Pur. Apl.* **46**, 147-156 (2013)
- [61] R. Ng, M. Levoy, M. Brédif, G. Duval, M. Horowitz, and P. Hanrahan, “Light field photography with a hand-held plenoptic camera,” *Stanford Tech. Rep. CSTR* **2**, 1-11 (2005).
- [62] A. Lumsdaine y T. Georgiev, “The focused plenoptic camera”, *Proc. IEEE International Conference on Computational Photography*, 1-8 (2009).
- [63] C. Perwass y L. Wietzke, “Single lens 3D-camera with extended depth-of-field”, *IS&T/SPIE Electronic Imaging. International Society for Optics and Photonics*, 829108–829108 (2012).
- [64] M. Damghanian, R. Olsson, M. Sjöström, A. Erdmann y C. Perwass, “Spatial resolution in a multi-focus plenoptic camera”, in *Image Processing (ICIP), 2014 IEEE International Conference on*, 1932-1936 (2014).
- [65] R. Ng, *Digital light field photography*, Ph. D. Thesis (Stanford University, 2006).
- [66] M. Martínez-Corral, A. Dorado, A. Llavador, G. Saavedra, and B. Javidi, “Three-Dimensional Integral Imaging and Display”, in *Multi-dimensional Imaging*, B. Javidi, E. Tajahuerce, and P. Andres, eds. (John Willey and Sons, 2014), pp. 243-265.
- [67] J.H. Park, G.Baasantseren, N. Kim, G. Park, J.M. Kang, and B.Lee, "View image generation in perspective and orthographic projection geometry based on integral imaging", *Opt. Express* **16**, 8800-8813 (2008).

- [68] M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, “Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope”, *Opt. Lett.* **22**, 1905–1907 (1997).
- [69] J. Huisken, and D. Y. R. Stainier, “Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology”, *Development* **136**, 1963–1975 (2009).
- [70] E. H. K. Stelzer, K. Greger y E. G. Reynaud, *Light Sheet Based Fluorescence Microscopy: Principles and Practice*, (Wiley-Blackwell, 2014).
- [71] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, (Plenum, 2006).
- [72] J. S. Jang and B. Javidi, “Three-dimensional integral imaging of micro-objects”, *Opt. Lett.* **29**, 1230–1232 (2004).
- [73] P.J. Evennett, and C. Hammond, “Microscopy Overview”, in *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, P. Worsfold, A. Townshend and C. Poole, eds. (Elsevier, 2005), pp. 32-41.
- [74] M. Abramowitz, K. R. Spring, H. E. Keller, and M. W. Davidson, “Basic principles of microscope objectives”, *BioTechniques* **33**, 772-781 (2002).
- [75] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, (McGraw-Hill, 1996).
- [76] M. Broxton, L. Grosenick, S. Yang, N. Cohen, A. Andalman, K. Deisseroth, and M. Levoy, “Wave optics theory and 3-D deconvolution for the light field microscope”, *Opt. Express* **21**, 25418–25439 (2013).
- [77] Y. T. Lim, J. H. Park, K. Ch. Kwon, and N. Kim, “Resolution-enhanced integral imaging microscopy that uses lens array shifting”, *Opt. Express* **17**, 19253–19263 (2009).
- [78] H. Navarro, E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra, A. Llavador, A. Dorado, M. Martínez-Corral, and B. Javidi, “Nonhomogeneity of lateral resolution in integral imaging”, *J. Display Technol.* **9**, 37–43 (2013).
- [79] K. Ch. Kwon, J. S. Jeong, M. U. Erdenebat, Y. L. Piao, K. H. Yoo, and N. Kim, “Resolution-enhancement for an orthographic-view image display in an integral imaging microscope system”, *Biomed. Opt. Express* **6**, 736–746 (2015).
- [80] A. Llavador, E. Sánchez-Ortiga, J.C. Barreiro, G. Saavedra, and M. Martínez-Corral “Resolution enhancement in integral microscopy by physical interpolation”, *Biomed. Opt. Express* **6**, 2854-2863 (2015).
- [81] K. C. Kwon, M. U. Erdenebat, M. A. Alam, Y. T. Lim, K. G. Kim, and N. Kim, “Integral imaging microscopy with enhanced depth-of-field using a spatial multiplexing”, *Opt. Express* **24**, 2072-2083 (2016).
- [82] A. Tolosa, R. Martínez-Cuenca, A. Pons, G. Saavedra, M. Martínez-Corral and B. Javidi, “Optical implementation of micro-zoom arrays for parallel focusing in integral imaging”, *J. Opt. Soc. Am. A*, **27**, 495–500 (2010).
- [83] F. O. Fahrbach, F. F. Voigt, B. Schmid, F. Helmchen, and J. Huisken, “Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens”, *Opt. Express* **21** 21010–21026 (2013).

- [84] M. Martínez-Corral, P. Y. Hsieh, A. Doblas, E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra y Y. P. Huang, “Fast axial-scanning widefield microscopy with constant magnification and resolution”, *J. Display Technol.* **11**, 913-920 (2015).
- [85] Y. Qu, and H. Yang, “Optical microscopy with flexible axial capabilities using a vari-focus liquid lens”, *J. Microsc.* **258**, 212–222 (2015).
- [86] C. Quillet, and B. Berge, “Electrowetting: A recent outbreak,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **6**,34–39 (2001).
- [87] B. Berge and J. Peseux, “Variable focal lens controlled by an external voltage: An application of electrowetting,” *Eur. Phys. J. E.* **3**, 159–163 (2000).
- [88] A. Llavador, E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra, and M. Martínez-Corral, “Improved depth of field in integral microscopy”, *Opt. Lett.* (en redacción.)
- [89] M. Martínez-Corral, G. Saavedra, E. Sánchez-Ortiga, A. Llavador, and J. Sola-Pikabea, “Microscopio integral, usos del mismo y sistema de microscopía integral”, Spanish patent P201531938.
- [90] A. Llavador, J. Sola-Pikabea, G. Saavedra, B. Javidi, and M. Martínez-Corral, “Resolution improvements in integral microscopy with Fourier plane recording”, *Opt. Express* **18**, 20792-20798 (2016).
- [91] M. Martínez-Corral, J.C. Barreiro, A. Llavador, E. Sánchez-Ortiga, J. Sola-Pikabea, G. Scrofani, and G. Saavedra, “Integral imaging with Fourier-plane recording”, *Proc. SPIE* **10219**, 102190B (2017).
- [92] S. H. Hong, and B. Javidi, “Improved resolution 3D object reconstruction using computational integral imaging with time multiplexing”, *Opt. Express* **12**, 4579–4588 (2004).
- [93] M. Cho and B. Javidi, “Computational reconstruction of three-dimensional integral imaging by rearrangement of elemental image pixels”, *J. Disp. Technol.* **5**, 61–65 (2009).
- [94] H. Navarro, G. Saavedra, A. Molina, M. Martínez-Corral, R. Martínez-Cuenca, and B. Javidi, “Optical slicing of large scenes by synthetic aperture integral imaging”, *Proc. SPIE* **7690**, 76900M (2010).
- [95] D. H. Shin, and H. Yoo, “Computational integral imaging reconstruction method of 3D images using pixel-to pixel mapping and image interpolation”, *Opt. Commun.* **282**, 2760–2767 (2009).
- [96] R. Ng, “Fourier slice photography”, *ACM Trans. Graph.* **24**, 735-744 (2005).
- [97] J. Y. Jang, J. I. Ser, S. Cha, and S. H. Shin, “Depth extraction by using the correlation of the periodic function with an elemental image in integral imaging”, *Appl. Opt.* **51**, 3279–3286 (2012).
- [98] J. Y. Jang, D. Shin, B. G. Lee, S. P. Hong, and E. S. Kim, “3D image correlator using computational integral imaging reconstruction based on modified convolution property of periodic functions”, *J. Opt. Soc. Korea* **18**, 388–394 (2014).

- [99] J. Y. Jang, D. Shin, and E. S. Kim, “Optical three-dimensional refocusing from elemental images based on a sifting property of the periodic δ -function array in integral-imaging”, *Opt. Express* **22**, 1533–1550 (2014).
- [100] A. Llavador, E. Sánchez-Ortiga, G. Saavedra, B. Javidi and M. Martínez-Corral, “Free-depths reconstruction with synthetic impulse response in integral imaging”, *Opt. Express* **23**, 30127-30135 (2015).
- [101] C. W. Helstrom, “Image restoration by the method of least squares,” *J. Opt. Soc. Am.* **57**, 297–303 (1967).
- [102] H. Navarro, A. Dorado, G. Saavedra, A. Llavador, M. Martínez-Corral, and B. Javidi, “Is it worth using an array of cameras to capture the spatio-angular information of a 3D scene or is it enough with just two?”, *Proc. SPIE* **8384**, 838406 (2012).