



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Métodos de reconstrucción de imágenes en microscopía de electrones

Autor:

Juan Carlos Lozano Sancho

Director:

Ricardo Celorrio de Pablo

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

2014

Métodos de reconstrucción de imágenes en microscopía de electrones

RESUMEN

Este trabajo fin de Máster tiene como objetivo establecer sinergias entre el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) y la Escuela de Ingeniería y Arquitectura en el ámbito de la tomografía de nanopartículas mediante microscopía de electrones.

El estilo de redacción tiene un enfoque didáctico con el fin de ser un texto de introducción acelerada en la materia a aquellos titulados en Ciencias o Ingeniería interesados en el tratamiento de imágenes de microscopía de electrones.

En este trabajo se establece la modelización matemática de la tomografía y su relación con la transformada de Radon. Además, se analizan las particularidades de la tomografía en microscopía de electrones debidas a la limitación en la adquisición de datos (problemas de ángulo limitado). Finalmente se realiza el estudio de software existente, y generación de software propio, de reconstrucción de imágenes.

Se ha establecido contacto con los investigadores del LMA, D. Raul Arenal y D. Alfonso Ibarra, a quienes quiero agradecer el favor y disponibilidad que han tenido en prestar todo el material y cuanta información se les ha solicitado con respecto a instalaciones, software y proyectos que desarrollan.

También se ha establecido un primer contacto con los investigadores del KTH Royal Institute of Technology in Stockholm, D. Holger Kohr y D. Ozam Öktem, en el marco del Workshop NanoMath2014 celebrado en Zaragoza. En este encuentro han mostrado su favorable disposición a participar en un proyecto común que suponga la mejora del software de reconstrucción del LMA.

Índice general

Índice de figuras	3
1 Introducción	5
2 La Transformada de Radon	7
2.1 La Transformada de Radon	7
2.2 Teorema de la Rebanada de Fourier	12
2.3 Algoritmo de Retroproyección Filtrada	13
3 Tomografía matemática	19
3.1 Origen de la Tomografía	20
3.2 Tomografía electrónica	23
3.3 Métodos actuales de representación	27
4 Metodología del LMA	33
5 Conclusiones	37
Bibliografía	39
A Análisis de Fourier	41
A.1 La Transformada de Fourier	41
A.2 La Transformada de Fourier y la convolución	43
A.3 Muestreo de señales	45
B Inversión de la Transformada de Radon	49
C Tomografía matemática. Difracción	53
C.1 Caso homogéneo	54
C.2 Caso no-homogéneo	56
C.3 Aproximación de Born	57

ÍNDICE GENERAL

C.4 Teorema de Difracción de Fourier	57
D Programas	61
D.1 Programas	62

Índice de figuras

2.1	Integral de línea de un objeto para una dirección dada.	8
2.2	Proyección paralela para dos direcciones distintas.	8
2.3	Gráfica de la proyección paralela de la función 2.3 a 0°	9
2.4	Objeto definido por una elipse y su sinograma.	10
2.5	Fantasma de Shepp-Logan para simulación y su correspondiente sinograma	11
2.6	Fantasma reconstruido con el algoritmo directo de Fourier a partir de 128 proyecciones y 128 rayos por proyección (A), y con 256 proyecciones y 256 rayos por proyección (B).	14
2.7	Retroproyecciones de una elipse con diferente número de proyecciones.	16
2.8	Fantasma recuperado a (32 proyecciones y 32 rayos en (A), 64 proyecciones y 64 rayos en (B), 256 proyecciones y 256 rayos en (C).	17
2.9	Objeto recuperado con un sensor defectuoso (128 proyecciones, 64 rayos.)	18
2.10	Fantasma recuperado con 128 proyecciones, 128 rayos, 100° en (A) y con 170° en (B).	18
3.1	Esquema de iluminación de una muestra homogénea. La fuente y el detector se colocan en lados opuestos de la muestra.	21
3.2	Propagación de un haz a través de una sección transversal de una muestra.	22
3.3	Etapas en la reconstrucción 3D de un objeto mediante tomografía electrónica. <i>Imagen obtenida de [2]</i>	24
3.4	El porta-muestras (a) permite una inclinación máxima de 42° . La modificación del porta-muestras (b) mejora este valor hasta los 60° . <i>Imagen obtenida de [8]</i>	25
3.5	La cuña corresponde a la zona del objeto que no ha sido muestreada.	25
3.6	Modelo utilizado para simular el TEM.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

4.1	Defecto en forma de plátano debido a un posicionamiento incorrecto en las imágenes. <i>Imagen obtenida de [11]</i>	35
4.2	Microscopio TITAN STEM instalado en el LMA. Permite la exploración tomográfica de muestras con +/- 70° de inclinación del eje.	36
A.1	Ejemplo de muestreo de una señal	47
C.1	Relación entre la transformada de Fourier de la proyección y la transformada de Fourier del objeto.	59
C.2	Los datos medidos se disponen sobre los arcos semicirculares.	60

1

Introducción

El origen de la tomografía aparece en el campo de la Astronomía, si bien su verdadero auge comienza tras la invención del escáner de Hounsfield en 1972, el cuál permitió obtener imágenes de diferentes estructuras del cuerpo humano impensables hasta entonces. La aplicación de la tomografía a la Medicina hace que surjan numerosos estudios y que evolucione este campo a pasos de gigante.

Además, las Ciencias Biológicas, con su demanda en la observación de micro-estructuras de virus, bacterias y nanofármacos, y la investigación en nuevos materiales, que requieren el conocimiento de su estructura a escala nanométrica, impulsan la mejora de las técnicas de microscopía existentes.

En este trabajo se introduce la técnica tomográfica y su aplicación a la reconstrucción de imágenes en diferentes campos como son la Medicina, la Biología, Nanociencia, Nanotecnología y la Ingeniería de la Ciencia de los Materiales.

El avance en la instrumentación microscópica ha conseguido llegar a unas resoluciones impensables no hace siquiera 100 años, sobre todo con la aparición, y su continua mejoría, de los equipos de microscopía con haz de electrones, que han revolucionado y agrandado el conocimiento que se posee sobre organismos y materiales.

1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo se desglosa en los siguientes apartados:

- se introduce la Transformada de Radon y sus propiedades más importantes de las que se hace uso en este trabajo. Se analizan diferentes algoritmos de reconstrucción de imágenes y se comentan diferentes problemas que aparecen cuando no se disponen de todos los datos o hay un fallo en algún elemento de captación de datos;
- se continúa con la descripción de la técnica tomográfica y su aplicación a la microscopía de electrones;
- se menciona las características del software de reconstrucción tomográfica que se usa en el Laboratorio de Microscopía Avanzada (LMA) del INA y sus contactos en el tema a nivel europeo;
- finalmente, se introduce una técnica de reconstrucción recientemente diseñada con notables mejoras respecto a las actualmente en uso. Esta técnica incorpora el modelo de dispersión de electrones y la óptica del microscopio; a pesar de ello, este método está escasamente difundido ya que requiere más conocimientos que la tomografía de rayos.

2

La Transformada de Radon

En este capítulo se introducen la transformada de Radon y su dual. Son las herramientas que permiten obtener la imagen a partir de sus proyecciones. Se estudian los conceptos básicos de proyección e integral de línea. Se demuestra el teorema de la rebanada de Fourier, pieza fundamental en todo el desarrollo de la teoría de recuperación del objeto a partir de sus proyecciones. Se desarrollan algunos algoritmos del problema inverso, como son el método directo de Fourier y el de retro-proyección filtrada. Se ponen ejemplos de simulación con el fantasma de Shepp-Logan, mediante la aplicación del algoritmo directo de Fourier y de retro-proyección filtrada, que permiten ver entre otras cosas los artefactos debidos a falta de datos por ángulo limitado o por fallo en un sensor de captación de datos.

2.1 La Transformada de Radon

La transformada de Radon “calcula proyecciones de objetos”. Un objeto está representado por una función $f(x)$ con $x \in \mathbb{R}^2$ que asocia una propiedad a cada punto del plano. Una proyección paralela en la dirección $(\cos \theta, \sin \theta)$ está caracterizada por las integrales de línea (figura 2.1) sobre todas las rectas perpendiculares a la recta que pasa por el origen de coordenadas y de dirección $(\cos \theta, \sin \theta)$ (figura 2.2).

2. LA TRANSFORMADA DE RADON

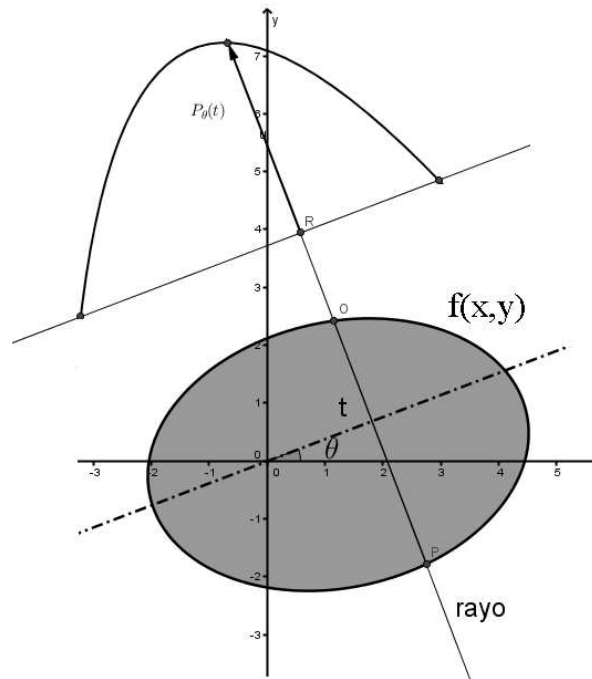


Figura 2.1: Integral de línea de un objeto para una dirección dada.

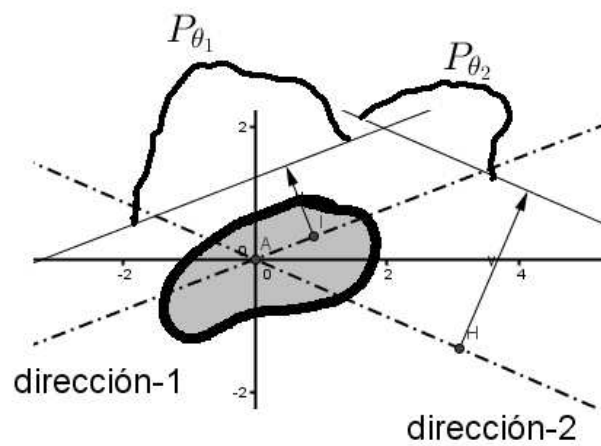


Figura 2.2: Proyección paralela para dos direcciones distintas.

Ejemplo. En \mathbb{R}^2 , una proyección viene dada por la expresión

$$P_\theta(t) = \int_L f(x, y) ds, \quad (2.1)$$

con el dominio de integración definido como

$$L = \{(x, y) \in \mathbb{R}^2 : x \cos(\theta) + y \sin(\theta) = t\}; \quad (2.2)$$

para el objeto circular

$$f(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } x^2 + y^2 \leq 1, \\ 0 & \text{en otro caso,} \end{cases} \quad (2.3)$$

en la figura 2.3 se representa la gráfica de su proyección para un ángulo de $\theta = 0^\circ$.

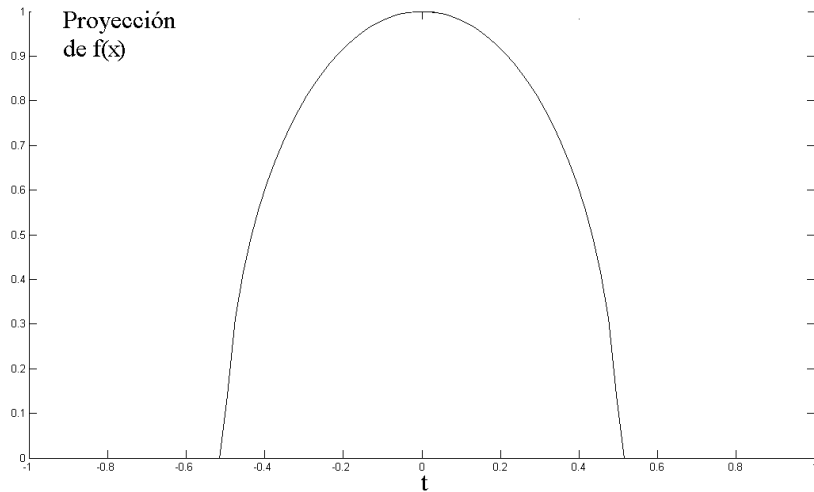


Figura 2.3: Gráfica de la proyección paralela de la función 2.3 a 0° .

Definición. Sean $s \in \mathbb{R}$, $w \in S^{n-1}$ y $f \in \mathcal{S}(\mathbb{R}^n)$, donde $\mathcal{S}(\mathbb{R}^n)$ es la clase de funciones de Schwartz. La *Transformada de Radon* de f es

$$Rf(w, s) = \int_{x \cdot w = s} f(x) dx. \quad (2.4)$$

La Transformada de Radon integra el objeto f en hiperplanos definidos por el vector dirección w . En el caso particular del plano se tiene $w = (\cos \theta, \sin \theta)$. El valor de s expresa la distancia respecto del origen de coordenadas, sobre la línea recta cuya dirección es w . El conjunto sobre el que se integra es el formado por todos los puntos del espacio que se proyectan en el punto de la

2. LA TRANSFORMADA DE RADON

recta de dirección w que está a distancia s del origen. Otra manera de expresar la integral viene dada por

$$Rf(w, s) = \int_{w^\perp} f(s \cdot w + y) dy, \quad (2.5)$$

donde $w^\perp = \{y \in \mathbb{R}^n : y \cdot w = 0\}$.

La expresión 2.5 refleja la idea de que para llegar a un punto del espacio podemos movernos primero en la dirección de la recta una distancia s y, posteriormente, ir en perpendicular a ella; es decir, $x = s \cdot w + y$. Obsérvese que se satisface la identidad $s = x \cdot w$.

La representación gráfica de la transformada de Radon de un objeto se denomina *sinograma*. El eje horizontal se etiqueta con el ángulo de las distintas direcciones medidas y el vertical con las distancias dadas por el valor de s . Cada punto cuyas coordenadas son (θ, s) se marca de un color (o un nivel de gris) según el valor de la transformada de Radon.

Ejemplo. En la figura 2.4 se muestran un objeto y su sinograma obtenido al realizar la Transformada de Radon. El objeto viene definido por una elipse de densidad $\rho = 1$ caracterizada por la función

$$f(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } \frac{x^2}{0,5^2} + \frac{y^2}{0,8^2} \leq 1, \\ 0 & \text{en otro caso.} \end{cases} \quad (2.6)$$

La expresión analítica de la transformada de Radon de $f(x)$ es

$$Rf(w, s) = \begin{cases} \frac{0,8}{a(\theta)^2} \sqrt{a(\theta)^2 - s^2} & \text{si } |s| \leq a(\theta), \\ 0 & \text{en otro caso,} \end{cases} \quad (2.7)$$

con $a(\theta)^2 = 0,25 \cos(\theta)^2 + 0,64 \sin(\theta)^2$.

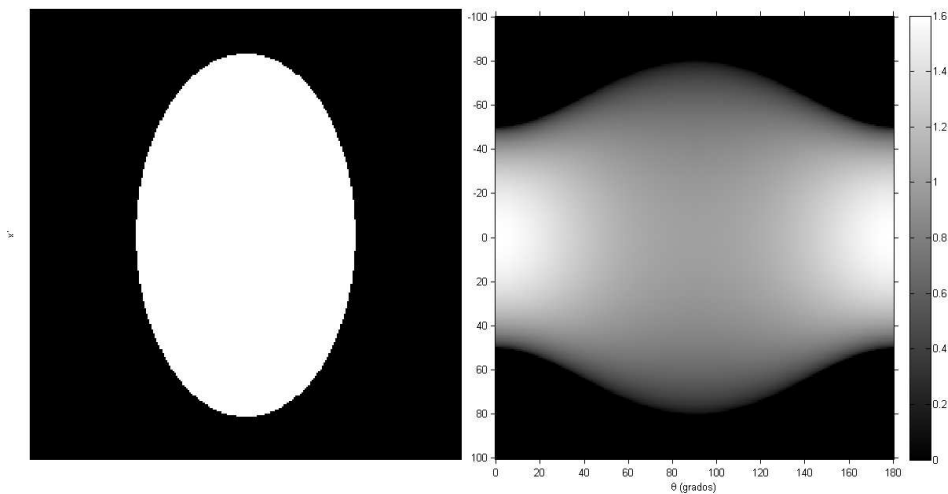


Figura 2.4: Objeto definido por una elipse y su sinograma.

En simulación numérica es frecuente realizar las pruebas con el modelo de fantasma de Shepp-Logan, con transformada de Radon conocida, cuyo imagen y su correspondiente sinograma se muestran en la figura 2.5.

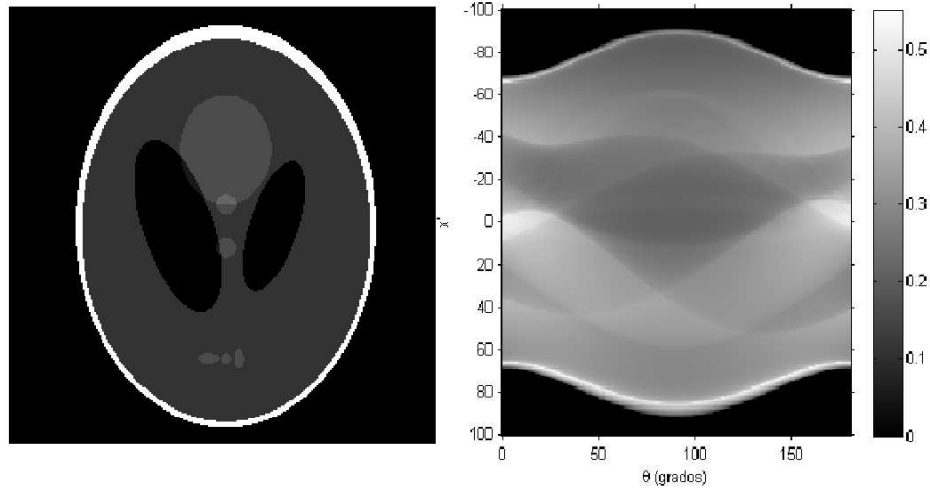


Figura 2.5: Fantasma de Shepp-Logan para simulación y su correspondiente sinograma

A partir de la definición se obtiene inmediatamente que la transformada de Radon posee simetría par, es decir, $Rf(-w, -s) = Rf(w, s)$.

En los algoritmos de reconstrucción tomográfica desempeñan un papel crucial las transformadas duales de Radon.

Definición. Se definen la *Transformada dual de Radon de $g(x)$ en dirección w* como

$$R_w^\sharp g(x) = g(x \cdot w). \quad (2.8)$$

y la *Transformada dual de Radon de $g(x)$* como

$$R^\sharp g(x) = \int_{S^{n-1}} g(w, x \cdot w) dw. \quad (2.9)$$

Es importante darse cuenta de que la transformada dual integra sobre todos los hiperplanos que pasan por el punto x .

Ejemplo. Sea $g(s) = s$ y $w = (\cos \theta, \text{sen } \theta)$. Es claro que la transformada dual de Radon en dirección w es $R_w^\sharp g(x, y) = x \cos \theta + y \text{sen } \theta$. Y es fácil calcular su transformada dual, que en este caso es $R^\sharp g(x, y) = 0$.

2. LA TRANSFORMADA DE RADON

La transformada dual tiene una estrecha relación con la transformada de Radon, pues es fácil comprobar que

$$\int_{\mathbb{R}} R_w f(s) g(s) ds = \int_{\mathbb{R}^n} f(x) R_w^\# g(x) dx. \quad (2.10)$$

Si se integra 2.10 en todo S^{n-1} se obtiene

$$\int_{S^{n-1}} \int_{\mathbb{R}} R_w f(w, s) g(w, s) ds dw = \int_{\mathbb{R}^n} f(x) R^\# g(x) dx. \quad (2.11)$$

Se destacan dos resultados muy importantes cuya demostración puede verse en [9].

Teorema. Para funciones f y g en la clase de funciones de Schwartz se tiene

$$(R^\# g) * f = R^\# (g * Rf). \quad (2.12)$$

Teorema. Para g en la clase de funciones de Schwartz, se cumple

$$(R^\# g)^\wedge(\xi) = (2\pi)^{(n-1)/2} |\xi|^{1-n} \left(\hat{g}\left(\frac{\xi}{|\xi|}, |\xi|\right) + \hat{g}\left(-\frac{\xi}{|\xi|}, -|\xi|\right) \right), \quad (2.13)$$

donde \wedge representa la transformada de Fourier. Además, si la función $(R^\# g)^\wedge$ es radial y \hat{g} es par, la fórmula anterior se simplifica a

$$\hat{g}(\rho) = \frac{1}{2} (2\pi)^{(1-n)/2} |\rho|^{n-1} (R^\# g)^\wedge(\rho). \quad (2.14)$$

2.2 Teorema de la Rebanada de Fourier

Existe una conexión importante entre la transformada de Radon y la transformada de Fourier en \mathbb{R}^n ([3] y apéndice A). Haciendo unos sencillos cálculos se obtiene

$$(R_w f)^\wedge(\xi) = (2\pi)^{-1/2} \int_{\mathbb{R}} R_w f(s) e^{-i\xi s} ds = (2\pi)^{-1/2} \int_{\mathbb{R}} \int_{w^\perp} f(s \cdot w + y) e^{-i\xi s} dy ds. \quad (2.15)$$

Realizando el cambio de variable $x = s \cdot w + y$ y recordando que $s = x \cdot w$ se llega a la expresión

$$(R_w f)^\wedge(\xi) = (2\pi)^{-1/2} \int_{\mathbb{R}^n} f(x) e^{-i\xi x \cdot w} dx = (2\pi)^{\frac{n-1}{2}} \hat{f}(\xi w), \quad (2.16)$$

en la que se relaciona la transformada de Fourier de $f(x)$ en la dirección definida por el vector w con la transformada de Fourier de la proyección del objeto f en esa misma dirección (Teorema de la rebanada).

Teorema de la rebanada de Fourier. Dada una función $f(x)$ con $x \in \mathbb{R}^n$, perteneciente a la clase de funciones de Schwartz, se cumple para $\xi \in \mathbb{R}$

$$(R_w f)^\wedge(\xi) = (2\pi)^{(n-1)/2} \hat{f}(\xi w). \quad (2.17)$$

Este resultado resuelve, al menos teóricamente, el problema de la obtención de un objeto $f(x)$ a partir de sus proyecciones. Según el teorema de la Rebanada de Fourier el método directo a seguir sería el siguiente:

1. Obtener las proyecciones paralelas para todas las direcciones.
2. Hallar la transformada de Fourier de las proyecciones obtenidas para cada dirección. Se obtiene el valor de la transformada en direcciones radiales en el dominio de Fourier.
3. Escribir la transformada de Fourier de $f(x)$ en \mathbb{R}^n a partir del paso anterior.
4. Realizar la transformada inversa de Fourier para recuperar $f(x)$.

Para hacer una simulación en el plano y comprobar los resultados se precisa tener en cuenta las siguientes observaciones:

- En la práctica real no se puede medir en todas las direcciones del plano. Se eligen un número determinado de direcciones w para obtener las proyecciones.
- No se pueden medir todas las integrales de línea para una dirección dada. Así pues, se elige un número determinado de rayos en cada dirección.
- La transformada de Fourier en \mathbb{R}^2 es conocida en puntos radiales del dominio de Fourier. Se debe aplicar algún método para conocer los valores en una malla rectangular y realizar la inversión correctamente.

Los resultados que se han obtenido implementando el procedimiento anterior (cuyos programas están incluidos en el apéndice) no son satisfactorios. Esto se observa claramente en las imágenes de la figura 2.6 reconstruidas con el algoritmo anterior interpolando al vecino más próximo para calcular el valor de la transformada de Fourier en una malla rectangular a partir de la malla radial.

2.3 Algoritmo de Retroproyección Filtrada

Quedó patente que la implementación para recuperar un objeto a partir de sus proyecciones mediante la aplicación directa del teorema de la rebanada de Fourier no proporciona imágenes adecuadas. El algoritmo de retroproyección filtrada produce una mejora sustancial y, mediante la aplicación de diferentes filtros, tal vez sea una de las mejores técnicas utilizadas hoy día. Su deducción al caso plano es sencilla [5]. Para una comprensión más profunda véase B.

2. LA TRANSFORMADA DE RADON

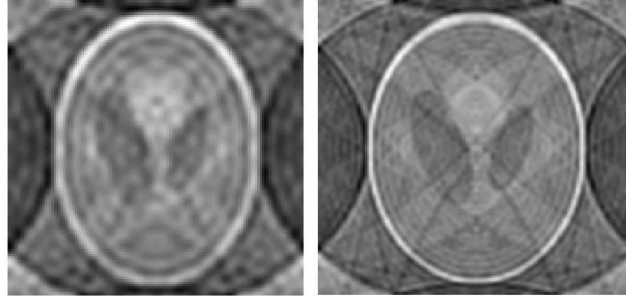


Figura 2.6: Fantasma reconstruido con el algoritmo directo de Fourier a partir de 128 proyecciones y 128 rayos por proyección (A), y con 256 proyecciones y 256 rayos por proyección (B).

Sea $f(x, y)$ el objeto a reconstruir. Denotemos $g = Rf(w, s)$ con $w = (\cos \theta, \sin \theta)$ los datos medidos por proyección paralela del objeto. Escribamos $f(x, y)$ como transformada de Fourier inversa de la siguiente manera:

$$f(x, y) = \int_{\mathbb{R}^2} F(u, v) e^{i2\pi(ux+vy)} du dv. \quad (2.18)$$

Realizando el cambio de coordenadas rectangulares (u, v) a coordenadas polares (ρ, θ) habitual

$$f(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_0^\infty F(\rho, \theta) e^{i2\pi\rho(x \cos \theta + y \sin \theta)} \rho d\rho d\theta. \quad (2.19)$$

Teniendo en cuenta que se cumple $F(\rho, \theta + \pi) = F(-\rho, \theta)$, la expresión anterior se puede escribir como

$$f(x, y) = \int_0^\pi \left(\int_{-\infty}^\infty F(\rho, \theta) |\rho| e^{i2\pi\rho s} d\rho \right) d\theta, \quad (2.20)$$

siendo $s = x \cos \theta + y \sin \theta$. Aplicando ahora el teorema de la rebanada de Fourier sabemos que $F(\rho, \theta) = (Rf_\theta)^\wedge(\rho)$. Por lo tanto,

$$f(x, y) = \int_0^\pi \left(\int_{-\infty}^\infty G_\theta(\rho) |\rho| e^{i2\pi\rho s} d\rho \right) d\theta, \quad (2.21)$$

siendo $G_\theta(\rho)$ la transformada de Fourier de $g = Rf(w, s)$.

La fórmula indica claramente los pasos a realizar para recuperar el objeto.

Primero. Calcular la transformada de Fourier de los datos de proyección g .

Segundo. Filtrar los datos. El factor ρ que multiplica a G en el dominio de Fourier se interpreta con un filtrado de la señal.

Tercero. Calcular la transformada inversa de Fourier de los datos filtrados. Se obtiene la proyección filtrada de los datos.

Cuarto. Calcular $f(x, y)$ retroproyectando cada proyección filtrada.

Se debe tener en cuenta que ρ tiene significado de frecuencia y, puesto que las señales suelen tener la mayor parte de su energía hasta una frecuencia de corte determinada, se puede suponer que la señal a reconstruir es de banda limitada. Así, deberemos conocer esa frecuencia de corte para poder realizar el muestreo de forma correcta, ajustando la velocidad de muestreo para que se cumplan las condiciones del teorema del muestreo.

La implementación del método queda de la siguiente manera:

Inicio. B es la frecuencia de corte. La velocidad de muestreo debe ser al menos el doble de ese valor es decir, $\tau = \frac{1}{2B}$.

Los datos medidos en las direcciones $w_i = (\cos \theta_i, \text{sen } \theta_i)$ con $i = 1, \dots, M$ son $g_{\theta_i}(j\tau)$ para $j = -N/2, \dots, N/2 - 1$. Siendo M el número de proyecciones y N de gran valor.

Primero. Aproximar la transformada de Fourier de una proyección como

$$G_{\theta_i}(\rho) \approx G_{\theta_i}\left(k \cdot \frac{1}{N\tau}\right) = \tau \sum_{j=-N/2}^{N/2-1} g_{\theta_i}(j\tau) e^{-i2\pi jk/N}. \quad (2.22)$$

Segundo. Filtrar la Señal. Debido a la existencia de ruido puede ser interesante usar un filtro de Hamming, coseno o el que se estime pertinente.

$$G_{\text{filt}\theta_i}(\rho) \approx G_{\text{filt}\theta_i}\left(k \cdot \frac{1}{N\tau}\right) = G_{\theta_i}\left(k \cdot \frac{1}{N\tau}\right) \cdot \left|k \cdot \frac{1}{N\tau}\right| \cdot H\left(k \cdot \frac{1}{N\tau}\right). \quad (2.23)$$

Tercero. Calcular la transformada inversa de Fourier.

$$Q_{\theta_i}(s) \approx Q_{\theta_i}(j\tau) = \frac{1}{N\tau} \sum_{k=-N/2}^{N/2} G_{\text{filt}\theta_i}\left(k \cdot \frac{1}{N\tau}\right) e^{i2\pi jk/N} \quad (2.24)$$

Cuarto. Calcular la aproximación $f(x, y)$. Siendo M el número de proyecciones,

$$f(x, y) \approx \frac{\pi}{M} \sum_{i=1}^M Q_{\theta_i}(x \cos(\theta_i) + y \text{sen}(\theta_i)). \quad (2.25)$$

En esta etapa se requiere hacer algún tipo de interpolación de los puntos de una malla radial a una malla rectangular.

A continuación se puede apreciar como actúa la retroproyección en una elipse para los casos de 1 proyección (figura 2.7 (A)), 4 proyecciones (figura 2.7 (B)), 8 proyecciones (figura 2.7 (C)) y 32 proyecciones (figura 2.7 (D)). Todas ellas a 128 rayos por proyección.

2. LA TRANSFORMADA DE RADON

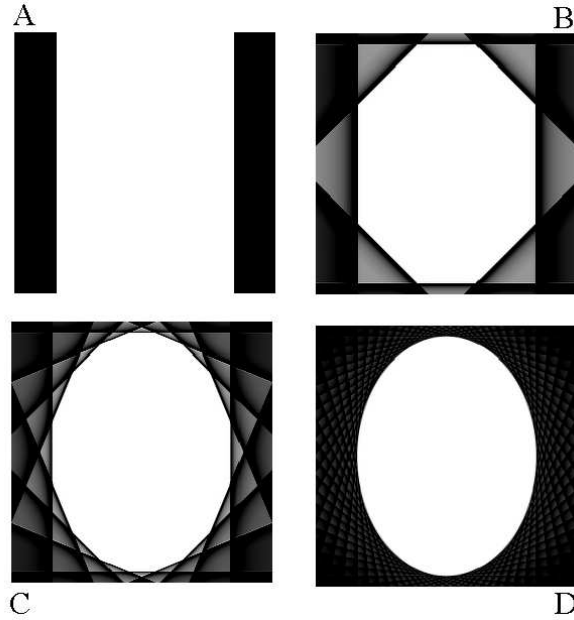


Figura 2.7: Retroproyecciones de una elipse con diferente número de proyecciones.

Se pueden conseguir mejores algoritmos si se parte de la fórmula introducida anteriormente

$$f(x) \approx R^\sharp(w * Rf), \quad (2.26)$$

siendo w una función filtro cuya transformada de Fourier es

$$\hat{w}(\rho) = \frac{1}{2}(2\pi)^{1/2-n}|\rho|^{n-1}\hat{\Phi}(|\rho|/B), \quad (2.27)$$

con B la frecuencia de corte y $0 \leq \hat{\Phi}(\sigma) \leq 1$ si $\sigma \leq 1$ y $\hat{\Phi}(\sigma) = 0$ si $\sigma > 1$.

Filtros muy utilizados en la práctica son el de *Ramachandran y Lakshminarayanan*

$$\hat{\Phi}(\sigma) = \begin{cases} 1 & \text{si } \sigma \leq 1, \\ 0 & \text{si } \sigma > 1 \end{cases} \quad (2.28)$$

y el de Shepp-Logan

$$\hat{\Phi}(\sigma) = \begin{cases} \text{sinc}(\sigma\pi/2) & \text{si } \sigma \leq 1, \\ 0 & \text{si } \sigma > 1. \end{cases} \quad (2.29)$$

El algoritmo de reconstrucción aplicado al caso de proyección paralela en el plano, siguiendo a [10], se implementa del siguiente modo:

Inicio. Se toman los datos de proyección $g = Rf$ para las direcciones $d_j = (\cos \theta_j, \text{sen } \theta_j)$ con $\theta_j = (j - 1)\pi/p$ donde p es el número de proyecciones.

2.3 Algoritmo de Retroproyección Filtrada

$s_l = l \cdot h$, siendo $h = 1/q$ con $l = -q, \dots, q$ los rayos en cada dirección.

Se realiza interpolación lineal y como regla de cuadratura de trapecios de p nodos.

Paso 1º. $\forall j = 1, \dots, p$, hacer las convoluciones

$$v_{j,k} = h \cdot \sum_{l=-q}^q w_B(s_k - s_l) g(d_j, s_l) \text{ para } k = -q, \dots, q. \quad (2.30)$$

Para w_B se elige el filtro de Ramachandran y Lakshminarayanan (filtro RamLak). Luego, para $B = \pi/h$

$$w_B(s_l) = \frac{B^2}{2\pi^2} \cdot \begin{cases} 1/4 & \text{si } l = 0 \\ 0 & \text{si } l \neq 0 \text{ y par} \\ -\frac{1}{\pi^2 l^2} & \text{si } l \text{ impar.} \end{cases} \quad (2.31)$$

Paso 2º. $\forall x$ donde reconstruir el objeto f , calcular la retroproyección discreta:

$$f_{FBI}(x) = \frac{2\pi}{p} \sum_{j=1}^p [(1-u) \cdot v_{j,k} + u \cdot v_{j,k+1}], \quad (2.32)$$

donde para cada x y j se obtienen k, u calculando $s = d_j \cdot x$, $k \leq s/h < k+1$ y $u = s/h - k$.

La simulación con el fantasma de Shepp-Logan proporciona los resultados que se muestran en las figuras 2.8 (A), (B) y (C) con diferente número de proyecciones y rayos por proyección.

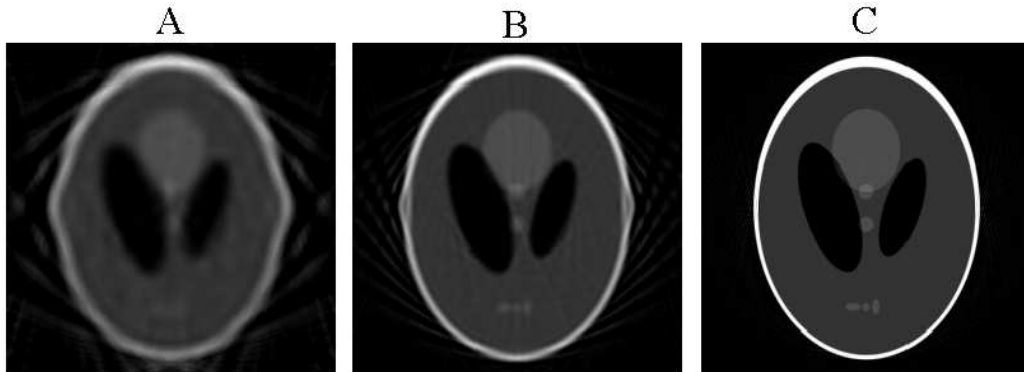


Figura 2.8: Fantasma recuperado a (32 proyecciones y 32 rayos en (A), 64 proyecciones y 64 rayos en (B), 256 proyecciones y 256 rayos en (C).

Es interesante saber cómo responde el algoritmo ante un error en uno de los sensores. Se ha simulado para el caso de una elipse, dando el valor nulo al valor recogido por el sensor. El resultado obtenido con 128 proyecciones y 64 rayos por proyección se muestra en la figura 2.9.

En las figuras 2.10 (A) y (B) se ha simulado el caso en el que no se pueda realizar la toma de datos en los 180 grados. Se puede ver que para un valor bajo del ángulo los resultados son totalmente

2. LA TRANSFORMADA DE RADON

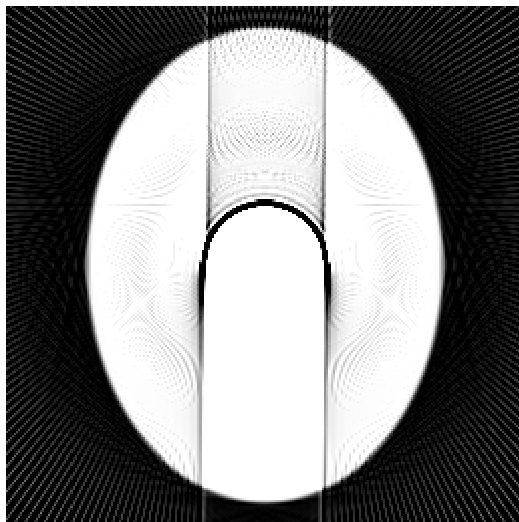


Figura 2.9: Objeto recuperado con un sensor defectuoso (128 proyecciones, 64 rayos.)

insatisfactorios. Este ejemplo introduce el problema importante de la recuperación de imágenes en microscopía electrónica cual es el problema de datos limitados en ángulo.

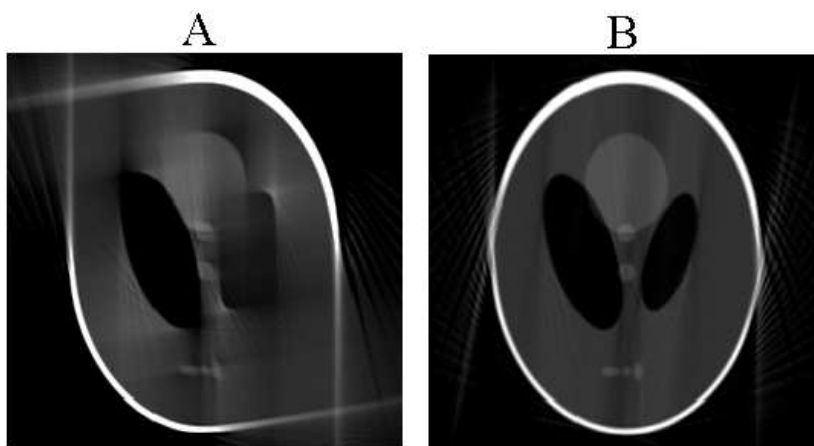


Figura 2.10: Fantasma recuperado con 128 proyecciones, 128 rayos, 100° en (A) y con 170° en (B).

3

Tomografía matemática

La tomografía es la representación de un objeto mediante secciones transversales a partir de datos recogidos tras la interacción del objeto con *algo* que ilumine dicho objeto. Ese algo pueden ser rayos-X, ondas de ultrasonido, isótopos radiactivos, un haz de electrones, etc. En el año 1979 reciben el Premio Nobel el ingeniero de la empresa discográfica EMI, N. Hounsfield (por la invención del escáner tomográfico computado de rayos-X) y el físico A. Cormack (quien desarrolló los algoritmos que hacen posible la reconstrucción de la imagen del objeto a partir de sus muestras). Con la invención del escáner se hace realidad práctica los resultados teóricos del matemático Radon en 1917, quién sentó las bases matemáticas de la tomografía al demostrar que un objeto $f(x)$ se podía recuperar a partir de sus integrales de línea.

En este capítulo se introducen los aspectos básicos de la tomografía computerizada y su aplicación a la microscopía de electrones. Se describe el caso de datos limitados por ángulo y su malplanteo. Finalmente se describe un método actual de reconstrucción de imágenes mucho mejor que los algoritmos usados en el Laboratorio de Microscopía Avanzada.

3.1 Origen de la Tomografía

La técnica empleada en el LMA para reconstruir un objeto a partir de los datos obtenidos en el microscopio electrónico se basa en la tomografía de rayos-X. Aunque su uso no es ciertamente correcto, pues supone que se ilumina con una fuente de fotones y no se tiene en cuenta la existencia de fenómenos de dispersión, es de fácil aplicación comparada con la técnica que estamos desarrollando y que sí considera la difracción del haz de electrones - que son las partículas realmente empleadas en el microscopio - cuando interacciona con la materia.

La primera aplicación práctica de la tomografía se produjo en el campo de la Astronomía, cuando Bracewell propuso un método para la reconstrucción de un mapa bi-dimensional de la emisión de microondas solares a partir de una serie de datos uni-dimensionales de haz de abanico medidos por un radio-telescopio.

La técnica tomográfica consiste en radiar el objeto con una fuente de energía y recoger, con el detector adecuado, la señal después de atravesar el objeto. Esta señal no será la misma que la emitida por la fuente, sino que habrá sufrido algún cambio. Deberá haber siempre algún tipo de interacción entre la señal emitida y el objeto que se desea ver; en otro caso, el objeto sería totalmente transparente y no podría ser representado. El tipo de información que se recoge deberá tener una dependencia con algún parámetro de la muestra. Sería deseable que fuera una dependencia monótona; por ejemplo, la energía absorbida por una muestra cuando es atravesada por una radiación caracterizada por su coeficiente de atenuación en función del espesor de la muestra.

En la figura 3.1 una fuente de rayos-X emite una radiación cuyo número de fotones es N_0 y que atraviesa el objeto de espesor x . En la transmisión de esta radiación pueden ocurrir dos efectos importantes:

- **La absorción fotoeléctrica.** El fotón de rayos-X cede su energía a los electrones internos de los átomos de la muestra.
- **La dispersión por efecto Compton.** El fotón interacciona con los electrones de la muestra cambiando su dirección de transmisión y perdiendo energía. Aunque las interacciones son de tipo inelástico, se pueden suponer elásticas cuando la pérdida de energía es despreciable.

En el caso de que todos los N fotones tengan la misma energía - radiación monocromática - podemos escribir

$$\frac{\Delta N}{N} \cdot \frac{1}{\Delta x} = -\tau - \sigma, \quad (3.1)$$

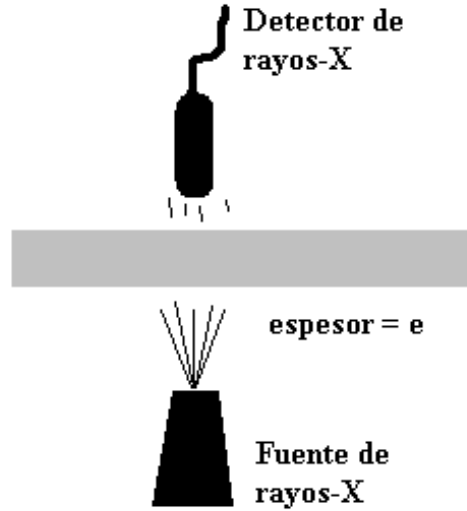


Figura 3.1: Esquema de iluminación de una muestra homogénea. La fuente y el detector se colocan en lados opuestos de la muestra.

donde los parámetros τ y σ representan las razones de pérdida del fotón por unidad de distancia debidas al efecto fotoeléctrico y el efecto Compton respectivamente. Es habitual reunirlos en un mismo parámetro μ , denominado *coeficiente de atenuación del material*, simplificando la ecuación como

$$\frac{\Delta N}{N} \cdot \frac{1}{\Delta x} = -\mu. \quad (3.2)$$

Haciendo infinitesimal el espesor de la muestra es correcto escribir

$$\frac{1}{N} dN = -\mu dx. \quad (3.3)$$

Considerando el caso que el coeficiente de atenuación sea constante se puede integrar 3.3 y obtener como resultado

$$N(x) = N_0 e^{-\mu x}. \quad (3.4)$$

Supongamos que el coeficiente de atenuación depende de las coordenadas espaciales x , y . Si la fuente de rayos-X emite en una dirección determinada por el ángulo θ un haz de anchura τ (figura 3.2) y suponiendo que todos los fotones son mono-energéticos, la expresión que proporciona el número N_d de fotones a la salida de la muestra viene dada por

$$N_d = N_0 e^{-\int_{\text{rayo}} \mu(x,y) ds}, \quad (3.5)$$

3. TOMOGRAFÍA MATEMÁTICA

o, equivalentemente

$$\int_{\text{rayo}} \mu(x, y) ds = \ln \frac{N_0}{N_d}. \quad (3.6)$$

La ecuación 3.6 es muy importante porque relaciona el valor de una integral de línea a partir de los valores medidos a la entrada y a la salida de la muestra. Puesto que las integrales de línea se expresan por la transformada de Radon puede recuperarse el valor de la atenuación en cada punto del objeto mediante la inversión de ésta última.

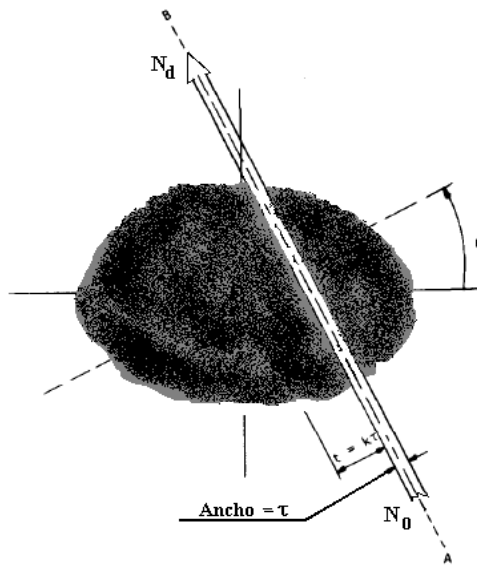


Figura 3.2: Propagación de un haz a través de una sección transversal de una muestra.

En el caso de que la fuente no emita fotones mono-energéticos debe obtenerse la distribución de fotones con respecto de la energía que poseen. Conocida la distribución $S_0(E)$ de energía de los fotones emitidos, la distribución de energía de los fotones que salen de la muestra y que son detectados viene dada por

$$S_{sal}(E) = S_0(E)e^{-\int \mu(x,y) ds}. \quad (3.7)$$

El número de fotones a la salida será

$$N_d = \int S_{sal}(E) dE. \quad (3.8)$$

Con el policromatismo surge un nuevo inconveniente; el *endurecimiento del haz*. Es consecuencia de que el coeficiente de atenuación del material depende del valor de la energía que posee el fotón. Esto supone un sesgo en la medida del conteo de los fotones a la salida y que es causa de

artefactos en las imágenes reconstruidas. Los fotones menos energéticos son absorbidos con mayor facilidad que los altamente energéticos. Una manera posible de abordar el problema es proponer un modelo adecuado para el coeficiente de atenuación.

Por sencillez en la explicación, supongamos que se trabaja con fotones mono-energéticos. Ya sabemos cómo medir la integral de línea del coeficiente de atenuación del material mediante la ecuación 3.6. El paso siguiente es registrar todas las medidas necesarias para aplicar la teoría de Radon y obtener el objeto. Las distintas formas de iluminar la muestra se han clasificado por generaciones. Las razones para el cambio de una a otra han sido la consecución de una mayor velocidad en la obtención de la imagen y un menor tiempo de exposición a la fuente radiante. En tejidos vivos es prioritario que la dosis de radiación no supere unos valores establecidos como seguros. El coste computacional, dada la ingente cantidad de cálculos involucrados, debe hacer viable el uso de la técnica tomográfica.

3.2 Tomografía electrónica

En la actualidad es necesario conocer la estructura tridimensional de muchas nanoestructuras tanto en el campo de las Ciencias de la Vida (virus, bacterias, macromoléculas, nanofármacos,...) como en el campo de la Ciencia y Tecnología de los materiales.

Con la Microscopía de luz hay un límite en la resolución que es posible alcanzar y que es insuficiente para esos fines perseguidos. Aunque es posible disponer de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), el número de átomos involucrados hace de este instrumento una herramienta nada práctica para trabajar a una escala nanométrica. Un punto intermedio se consigue con las técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Con este instrumento pueden obtenerse tanto patrones de difracción como imágenes de la muestra que se analiza [13].

La técnica de la Tomografía de electrones [7] va a permitir tener una serie de imágenes 2D para diferentes orientaciones del ángulo de inclinación del eje del porta-herramientas; imágenes dispuestas en planos ortogonales a este eje. Variando la inclinación del eje en incrementos de 1° ó 2° , por ejemplo, se obtienen diferentes proyecciones de las secciones de la muestra. Una vez se ha realizado la adquisición de los datos se realiza la unión de las diferentes imágenes para obtener la representación 3D de la muestra (Figura 3.3).

Para que la reconstrucción del objeto sea correcta es necesario conseguir datos completos para todos los ángulos de inclinación. Pero esto no es posible por la propia construcción del instrumento; en concreto, del porta-muestras. Así, puede conseguirse un rango de inclinación de -60° a 60° , y

3. TOMOGRAFÍA MATEMÁTICA

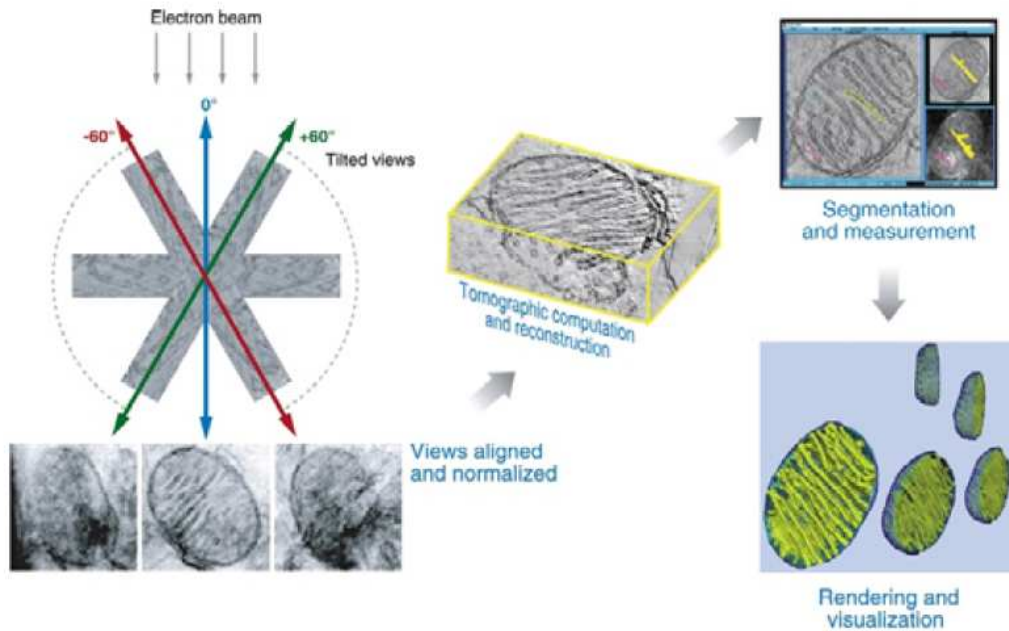


Figura 3.3: Etapas en la reconstrucción 3D de un objeto mediante tomografía electrónica. *Imagen obtenida de [2]*

mediante una construcción esmerada, se pueden obtener mayor inclinaciones. En la figura 3.4 se observa un porta-muestras de ángulo único estándar Philips CM300 (a), el cual permite una inclinación máxima de 42° . Una mayor inclinación provocaría que la herramienta golpeará las piezas polares de las lentes objetivo. Para mejorar este límite el porta-muestras Philips EM400 (b) presenta una anchura de 4 mm que le permite girar completamente dentro del hueco de las lentes objetivo sin que haya colisión alguna. Aun así, el máximo ángulo de inclinación es de 60° ; a partir de este valor, la propia herramienta intercepta el haz incidente y produce sombra.

Por lo dicho, el problema tomográfico es el de la recuperación de un objeto a partir de sus proyecciones con datos de ángulo limitado. Se sabe que es un problema severamente mal-planteado en sentido de Hadamard. Hay una carencia de datos (figura 3.5) de toda una cuña que no puede ser muestreada con el haz de electrones. Y no sólo es el propio diseño de la herramienta la que limita el ángulo máximo de adquisición de datos. El espesor de la muestra también lo limita debido al hecho de que a mayor inclinación de la muestra mayor será el espesor del objeto que debe atravesar el haz, con la consiguiente pérdida de resolución que ello conlleva.

Por otra parte, es imprescindible asumir unas hipótesis de partida. Una de ellas es el *requisito*

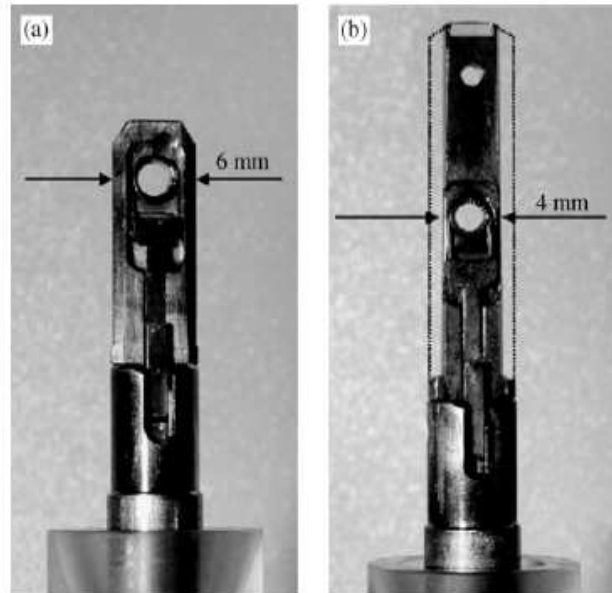


Figura 3.4: El porta-muestras (a) permite una inclinación máxima de 42° . La modificación del porta-muestras (b) mejora este valor hasta los 60° . *Imagen obtenida de [8]*

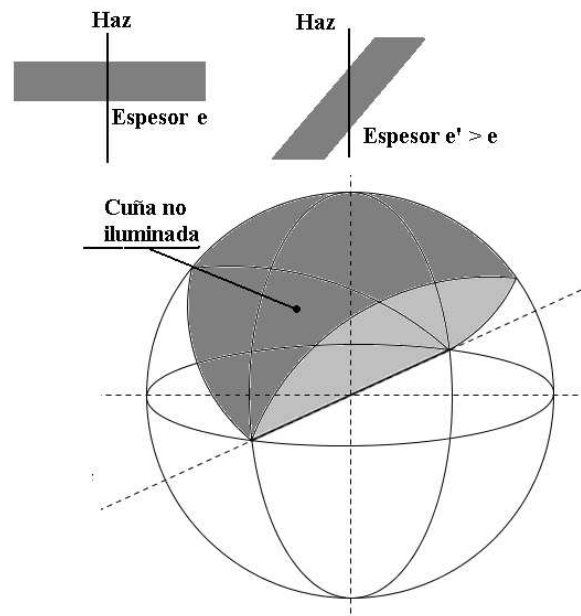


Figura 3.5: La cuña corresponde a la zona del objeto que no ha sido muestreada.

3. TOMOGRAFÍA MATEMÁTICA

de proyección [8] que exige haya una cierta función que varíe monótonamente respecto de alguna propiedad física del objeto. Así, la tomografía de campo-claro, se basa en la asunción de que el contraste masa-espesor debido a la dispersión atómica elástica es la dominante. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de campo-claro (BF-TEM) de muestras biológicas presentan contraste masa-espesor y cumplen el requisito de proyección.

Muy diferente es el caso de muestras cristalinas para las cuales el contraste de campo-claro (BF) depende de las condiciones difractantes del propio cristal y que hacen que desaparezca la dependencia monótona con el espesor de la muestra por la que pasa el haz. Por lo cual, fracasa el requisito de proyección, y ya no sería aplicable la técnica tomográfica.

Obtenidas las diferentes imágenes de las secciones correspondientes a cada inclinación debe realizarse la alineación de éstas de manera adecuada. Para ello es importante tener localizado el eje de inclinación en cada momento. Pueden usarse marcadores fiduciales - con partículas de oro - para rastrear el movimiento en la serie de imágenes inclinadas; o bien, mediante correlación cruzada determinar los cambios producidos en las imágenes cuando no es posible el uso de esos marcadores. En el caso que se produjera un des-alineamiento del eje de inclinación en la serie de micrografías tomadas, aparecerían artefactos en forma de arcos que emborronarían la imagen.

Por último, mencionar que si se considera el caso de eje único de inclinación y suponiendo alineamiento del eje perfecto para toda la serie de proyecciones obtenidas, la resolución en la dirección paralela al eje de inclinación (d_x) coincide con la resolución de las proyecciones. Mas no ocurre así en las otras dos direcciones, perpendiculares a ella. Ahora depende del número de proyecciones tomadas N y del diámetro D del volumen del objeto a reconstruir. Las resoluciones valen ahora

$$d_y = \frac{\pi D}{N}, \quad (3.9)$$

$$d_z = d_y \cdot e_{yz}, \quad (3.10)$$

donde e_{yz} se denomina elongación, y su valor teórico es

$$e_{yz} = \sqrt{\frac{\alpha + \text{sen}(\alpha) \cos(\alpha)}{\alpha - \text{sen}(\alpha) \cos(\alpha)}}. \quad (3.11)$$

Esta anisotropía viene dada por la limitación en el ángulo que puede inclinarse la muestra con el porta-muestras y que produce la pérdida de datos en forma de cuña vista anteriormente.

Además de lo dicho, uno de los mayores problemas que ha de resolverse en tomografía de electrones es la dosis a la que se exponen los especímenes biológicos. Deben usarse dosis bajas para evitar la ionización causada por las colisiones inelásticas y que llegan a producir calentamiento de

las muestras, descomposición radio-química (radiólisis) y rotura de enlaces químicos. Ello motiva reducir la temperatura considerablemente (crio-preparación) y que el tiempo de exposición al haz de electrones sea menor de lo que sería deseable. Todo esto repercute para que la razón señal-ruido conseguida sea baja y limite la resolución que se obtiene al recuperar la imagen.

Descritos los aspectos básicos de la tomografía de electrones, queda dar un modelo del TEM que permita definir y resolver dos problemas: el problema directo y el problema inverso.

Un modelo ampliamente usado en tomografía de electrones viene dado en [4]. En la figura 3.6, el eje óptico está definido por la dirección ω . Perpendicular al mismo se sitúan los planos objeto, focal e imagen, y el plano de las lentes. Las aperturas correspondientes son los sub-dominios Σ . Se supone que la distancia focal f es positiva y que $r > f$, con r la coordenada del plano imagen. Se asume que el sistema verifica la ecuación de Abbe $\frac{1}{r} + \frac{1}{q} = \frac{1}{f}$. Básicamente, el problema directo resuelve la señal de intensidad de una onda que ha sido dispersada por la muestra, caracterizada por un potencial de dispersión complejo y obtenida en los píxeles de las correspondientes micrografías cuando se ha emitido una onda incidente monocromática conocida. El sistema del TEM está caracterizado a su vez por un operador que engloba todos los efectos del sistema óptico y tiene en cuenta, además, la adición del ruido que producen los propios elementos de detección del TEM, y parámetros propios del aparato que son valorados mediante un proceso de calibración.

El problema inverso corresponde a la búsqueda de ese potencial de dispersión de la muestra, conocidas las muestras recogidas en las micrografías, afectadas por ruido y para un conjunto de direcciones limitado de haz de electrones incidentes (problema de datos limitados por ángulo). Como en el problema directo, se supone conocido el operador de transmisión de la onda incidente a la onda de salida en el captador y que modela el esquema dado en la figura 3.6. (Véase el apéndice C para un análisis en más profundidad del cálculo de la onda dispersada por un medio difractante.)

3.3 Métodos actuales de representación

En la actualidad son tres los tipos de métodos de reconstrucción de imágenes implementados en los paquetes de software. En el primer tipo, se escribe la función incógnita como expansión de funciones básicas más sencillas de analizar tanto numéricamente como analíticamente. Se obtiene un sistema de ecuaciones de grandes dimensiones y de tipo sparse que puede resolverse por el método clásico de Kaczmarz; el ART (Técnica de Reconstrucción Algebraica, el SIRT y el SART pertenecen a este grupo. Otro tipo de métodos se basan en maximizar la probabilidad de cierto funcional que dependa del modelo propuesto y que tenga en cuenta las características de ruido que se producen

3. TOMOGRAFÍA MATEMÁTICA

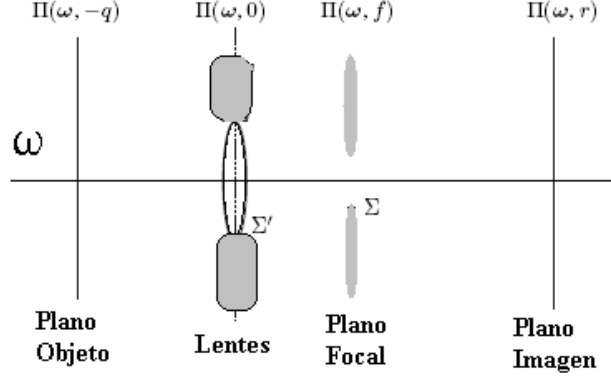


Figura 3.6: Modelo utilizado para simular el TEM.

en la imagen. El tercer tipo se basa en la obtención de una fórmula aproximada de inversión (caso de retro-proyección filtrada).

Uno de los mejores métodos de reconstrucción en tomografía de electrones corresponde al modelo cuyo esquema se representa en la figura 3.6. Para unos datos de medida g_ω la ecuación que modela este esquema es

$$g_\omega = \mathcal{D}^M \mathcal{C}_\sigma \mathcal{P}_\omega f. \quad (3.12)$$

Esta ecuación tiene en cuenta la dispersión debida a la interacción de los electrones con el espécimen, las características del sistema óptico del microscopio y el aumento de la imagen proyectada.

El objeto se define por una función f que depende del coeficiente de refracción del espécimen. Siendo n el coeficiente de refracción en cada punto de la muestra, f es la parte real de $1 - n^2$. Puesto que el medio en el que está la muestra tiene índice de refracción unidad, podemos suponer que el soporte de la función f está contenido en cierta bola de radio ρ alrededor del origen.

Cuando una onda plana monocromática de ecuación $\Psi(x) = e^{ik(\omega \cdot x)}$ incide en la muestra, los fenómenos de difracción que se producen dependen del valor de f según la transformada de rayos-X definida como

$$\mathcal{P}_\omega f(\eta) = \int_{\mathbb{R}} f(t\omega + \eta) dt, \quad \eta \in \omega^\perp. \quad (3.13)$$

Se puede considerar como una proyección plana del objeto donde cada punto actúa como fuente secundaria emisora de ondas circulares de acuerdo al Principio de Huygens.

La influencia del sistema óptico del TEM se define mediante convolución de un núcleo K_σ con la correspondiente señal $u(\eta) = \mathcal{P}_\omega f(\eta)$. Concretamente,

$$\mathcal{C}_\sigma u(\eta) = \int_{\omega^\perp} K_\sigma(\eta - \xi) u(\xi) d\xi. \quad (3.14)$$

El núcleo se define a partir de su transformada de Fourier T_σ por

$$\widehat{K}_\sigma(\xi) = T_\sigma(\xi) = \sigma T^{re}(\xi) + T^{im}(\xi), \quad (3.15)$$

donde T^{re} y T^{im} son la parte real e imaginaria de la llamada *función de transferencia de contraste* (CTF) definida como

$$T(\xi) = (2\pi)^{-1} \tilde{T}(|\xi|^2), \quad (3.16)$$

$$\tilde{T}(s) = \aleph(s) a(s)^{-1} e^{iq(a(s)-k+\frac{s}{2k})} e^{i\gamma_p(s)} e^{-\gamma_e(s)}, \quad (3.17)$$

siendo $a(s) = (k^2 - s)^{1/2}$, \aleph la función característica de un intervalo dependiente del radio de apertura, q es la distancia entre los planos de las lentes y el objeto. γ_p y γ_e son polinomios que definen un factor de fase y un factor envolvente. El valor del parámetro σ depende del espécimen y debe ser estimado. Este valor, además, ha de ser positivo.

El último operador, que tiene en cuenta el aumento de la imagen, es una dilatación isótropa definida como

$$\mathcal{D}^M u(\eta) = M^{-1} u(M^{-1} \eta). \quad (3.18)$$

Debido a las peculiaridades propias del porta-especímenes, el ángulo de rotación θ con el que se ilumina la muestra está limitado a un rango inferior a 180° . Debido a ello, los valores de ω pertenecen al conjunto $\mathcal{S}_0^2 = \{(0, \sin \theta, \cos \theta) | \theta \in [-\theta_0, \theta_0]\}$, con $\theta_0 < 90^\circ$.

El dominio de todas las medidas se define mediante el conjunto

$$\mathcal{F} := \{(\omega, \eta) | \omega \in \mathcal{S}_0^2, \eta \in \omega^\perp\}. \quad (3.19)$$

Con los conjuntos y operadores introducidos, el *problema directo en tomografía de electrones* tiene como objetivo hallar el valor de los datos g_ω a partir de f y del operador directo definido por

$$\mathcal{A}_\sigma := \mathcal{D}^M \mathcal{C}_\sigma \mathcal{P}_\omega, \quad (3.20)$$

con dominio en $L^2(B_\rho)$ y rango en $L^2(\mathcal{F})$.

Por el contrario, el *problema inverso de la tomografía de electrones* se propone recuperar $f(x)$, con $|x| < \rho$, a partir de los datos $g(\omega, \eta) = \mathcal{A}_\sigma f(\omega, \eta) \forall (\omega, \eta) \in \mathcal{F}$.

3. TOMOGRAFÍA MATEMÁTICA

Este problema es muy difícil de resolver debido al mal-planteo del problema en sentido de Hadamard debido a datos limitados por ángulo, el fuerte ruido en los datos obtenidos, los problemas de des-alineamiento del eje de las diferentes imágenes (que precisan un pre-procesado) y el alto coste computacional requerido.

Un método novedoso propuesto en [6] se basa en la técnica de la *inversa aproximada*. Se precalcula un núcleo Ψ_γ de reconstrucción como solución al problema adjunto con un suavizador E_γ elegido. La aplicación de Ψ_γ a los datos medidos da lugar a una versión suave de la solución del problema original. Además, el suavizador se conoce de forma exacta y está libre de errores en los datos por lo que el núcleo de reconstrucción se determina de manera estable. Esta propiedad y otras de invarianza permiten una implementación rápida del algoritmo.

Definiciones. Sea $\mathcal{A} : X \rightarrow Y$ un operador lineal acotado entre $X = L^2(\mathbb{R})$ y un espacio de Hilbert Y . Sea f solución de la ecuación

$$\mathcal{A}f = g \text{ para un elemento dado } g \in Y. \quad (3.21)$$

Una función $E_\gamma : \mathbb{R}^3 \times \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{C}$ cumpliendo $E_\gamma(x, \cdot) \in X$ para todo $x \in \mathbb{R}^3$ se llama *suavizador* si aproxima la distribución δ en el sentido que para una función $f \in X$ cualquiera verifica

$$\lim_{\gamma \rightarrow 0} \langle f, E_\gamma(x, \cdot) \rangle_X = f(x) \quad \text{c.t.p.}, \quad (3.22)$$

$$\int_{\mathbb{R}^3} E_\gamma(x, y) dy = 1 \quad \forall \gamma. \quad (3.23)$$

Se define *solución aproximada* de la ecuación $\mathcal{A}f = g$ a

$$f_\gamma(x) := \langle f, E_\gamma(x, \cdot) \rangle_X, \quad (3.24)$$

que converge a la solución exacta f para $\gamma \rightarrow 0$. Supongamos que $\Psi_\gamma : \mathbb{R}^3 \rightarrow Y$ resuelve la familia de ecuaciones adjuntas

$$\mathcal{A}^*[\Psi_\gamma(x)] = E_\gamma(x, \cdot) \quad (3.25)$$

entonces se cumple

$$f_\gamma(x) = \langle f, \mathcal{A}^*[\Psi_\gamma(x)] \rangle_X = \langle \mathcal{A}f, \Psi_\gamma(x) \rangle_Y = \langle g, \Psi_\gamma(x) \rangle_Y. \quad (3.26)$$

Por lo tanto, el cálculo de f_γ se reduce a los cálculos del producto escalar entre Ψ_γ y los datos g .

Definición. La función $\Psi_\gamma : \mathbb{R}^3 \rightarrow Y$ que resuelve la ecuación 3.25 para cada $x \in \mathbb{R}^3$ se llama *Núcleo de reconstrucción* para la inversión del operador \mathcal{A} . El operador lineal $\mathcal{S}_\gamma : Y \rightarrow X$ definido por

$$\mathcal{S}_\gamma g(x) = \langle g, \Psi_\gamma(x) \rangle_Y \quad (3.27)$$

se llama *inverso aproximado* del operador \mathcal{A} .

Para evitar resolver una ecuación adjunta para cada punto x se usan suavizadores de tipo convolución dependientes sólo de la diferencia de los argumentos,

$$E_\gamma(x, y) = \mathcal{T}^x e_\gamma(y) = e_\gamma(x - y). \quad (3.28)$$

Con esta simplificación la solución aproximada viene expresada como

$$f_\gamma(x) = \int_{\mathbb{R}^3} e_\gamma(x - y) f(y) dy. \quad (3.29)$$

Es fácil probar que si $\mathcal{T}_1^x : X \rightarrow X$ y $\mathcal{T}_2^x : Y \rightarrow Y$ son dos operadores que cumplen la propiedad de invarianza

$$\mathcal{T}_1^x \mathcal{A}^* = \mathcal{A}^* \mathcal{T}_2^x \quad (3.30)$$

y, además, si para $e_\gamma \in X$ la función $\phi_\gamma \in Y$ resuelve la ecuación

$$\mathcal{A}^* \phi_\gamma = e_\gamma \quad (3.31)$$

entonces una solución de la ecuación $\mathcal{A}^*[\Psi_\gamma(x)] = \mathcal{T}_1^x e_\gamma$ viene dada por

$$\Psi_\gamma(x) = \mathcal{T}_2^x \phi_\gamma. \quad (3.32)$$

En [6] se aplica esta teoría al caso del operador de tomografía de electrones $\mathcal{A}_\sigma := \mathcal{D}^M \mathcal{C}_\sigma \mathcal{P}_\omega$, cuyo operador adjunto $\mathcal{A}_\sigma^* := \mathcal{P}_\omega^* \mathcal{C}_\sigma \mathcal{D}^{1/M}$ tiene retroproyección

$$\mathcal{P}^* g(y) = \int_{\mathbb{S}_0^2} g(\omega, P_{\omega^\perp} y) d\omega, \quad P_{\omega^\perp} = y - \langle y, \omega \rangle \omega \quad (3.33)$$

y el núcleo de reconstrucción asociado al suavizador e_γ se obtiene resolviendo el problema adjunto

$$\mathcal{P}_\omega^* \mathcal{C}_\sigma \mathcal{D}^{1/M} \phi_\gamma = e_\gamma. \quad (3.34)$$

El resultado que se obtiene para la aproximación $f_\gamma(x)$ es

$$f_\gamma(x) = \mathcal{S}_\gamma g(x) = \int_{\mathbb{S}} (g * \phi_\gamma)(\omega, MP_{\omega^\perp} x) d\omega. \quad (3.35)$$

Esta fórmula es de tipo retroproyección filtrada y pueden aplicarse técnicas FFT eficientes en su implementación.

4

Metodología del LMA

El Laboratorio de Microscopía Avanzada (LMA) representa una iniciativa única a nivel nacional e internacional. Su objetivo es proporcionar a la comunidad científica el equipo más avanzado existente y las infraestructuras de sonda local y microscopía electrónica para la observación, caracterización, nano-estampación y la manipulación de materiales a escala atómica, así como una amplia gama de herramientas científicas dedicadas a la caracterización, procedimientos de procesamiento y manejo en la escala nanométrica.

El Laboratorio de Microscopía Avanzada depende administrativamente de la Universidad de Zaragoza a través del Instituto de Nanociencia de Aragón. El director del INA es también el director del LMA. Un comité científico internacional evalúa periódicamente las actividades del LMA y ofrece servicios de evaluación para la mejora. Las actividades científicas del LMA son administradas por tres supervisores de área, coordinados por el coordinador del LMA. Cada supervisor de área es responsable de los equipos y del personal técnico asignado a su área y, en general, para todas las cuestiones organizativas de la zona.

El mayor reto que se propone el LMA es convertirse en un laboratorio de referencia internacional para promover y establecer nuevos puentes entre los científicos y las empresas a través de la formación de alto nivel basada en las infraestructuras de primer nivel y la amplia experiencia en

4. METODOLOGÍA DEL LMA

Microscopía Avanzada.

Un Comité Científico se encarga de proporcionar apoyo científico y asesora al Consejo de Administración. Se compone de científicos de reconocido prestigio internacional en el campo de Microscopía Avanzada, con destacada trayectoria profesional y científica en línea con los objetivos de LMA.

El LMA colabora con el grupo EMAT de la Universidad de Antwerp (Bélgica), el cual posee uno de los laboratorios más importantes del mundo en este campo, y ambas ofrecen la experiencia de sus investigadores y personal técnico a aquellas empresas privadas que le piden su ayuda para resolver sus problemas de producción y mejora de productos en programas de I+D.

Entre los proyectos que realiza el grupo EMAT en Antwerp, con quien el LMA mantiene contactos, destacan los de la Dra. Sara Bals y el del Dr. Gustaff Van Tendeloo.

El objetivo del primero de ellos, llamado *Colouratoms* [1], es proporcionar una caracterización completa 3D del complejo hetero-nanosistemas a escala atómica. La combinación de aberración corregida en microscopía electrónica avanzada y nuevos algoritmos de reconstrucción 3D se concibe como un nuevo enfoque innovador para cuantificar la posición y el color (naturaleza química y unión) de cada átomo individual en 3D para cualquier nanomaterial determinado. El resultado del proyecto permitirá entender el comportamiento físico a nivel de mecánica cuántica. Una vez que se entienda la conexión entre la estructura atómica y las propiedades físicas se podrán diseñar nuevas estructuras de nanopartículas.

El segundo de ellos, llamado *Countatoms* [12], permitirá obtener información - a una resolución de 50 pm y una energía de resolución de 100 meV - sobre el comportamiento de materiales cerámicos multicapa y poder realizar el conteo del número de átomos de una columna atómica.

Para llevar a cabo todos estos ambiciosos proyectos el LMA dispone de los mejores equipos de microscopía del mundo (figura 4.2). Pero es muy importante contar con un paquete de software que permita reconstruir las imágenes de todos los objetos que se analizan. Usan el software **Inspect-3D** de FEI para el tratamiento y la reconstrucción de imágenes y el software **Amira** para el tratamiento posterior del objeto reconstruido. Los algoritmos de reconstrucción que utilizan no son actualmente los mejores, pues hacen uso de la aproximación por rayos-X sin tener en cuenta los fenómenos de dispersión electrónica como estamos haciendo nosotros.

El procedimiento que llevan a cabo una vez obtenida la serie de micrográficas con el equipo de TEM es el siguiente [11]:

1. **Preparación de los datos.** Antes de aplicar un algoritmo de reconstrucción puede ser conveniente eliminar datos adquiridos, establecer el tamaño en píxeles y, por supuesto, realizar

la alineación del eje de todas las micrografías. Este paso es demasiado importante y requiere práctica en el uso del software para llevarlo a cabo adecuadamente; en algunos casos puede ser necesario realizar el ajuste del eje manualmente. Hay que intentar que tanto la posición del eje de inclinación, como su ángulo sean los adecuados. De no ser así, aparecen objetos en forma de plátano - en el caso de posicionamiento incorrecto del eje - y cambios en la orientación de esas marcas según varía la serie de imágenes - en el caso de mal ajuste del ángulo del eje - (figura 4.1).

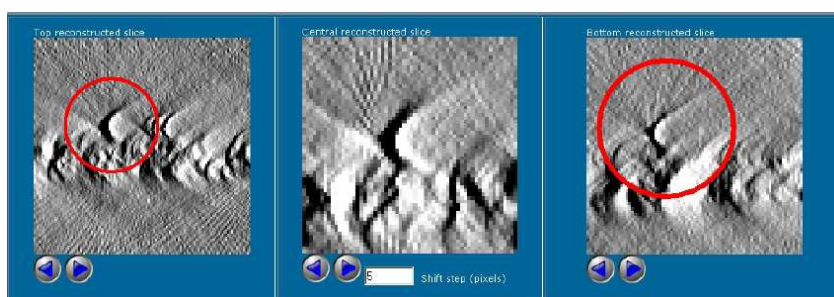


Figura 4.1: Defecto en forma de plátano debido a un posicionamiento incorrecto en las imágenes. *Imagen obtenida de [11].*

2. **Reconstrucción de los datos.** Se selecciona el volumen a reconstruir y se aplica el método deseado de reconstrucción. En esta fase se puede elegir entre métodos algebraicos tipo ART, SIRT y de retroproyección. Pero hay que destacar que todos ellos se basan en la aproximación de rayos-X y de ninguna manera se tiene en cuenta los fenómenos de difracción en las ecuaciones. Este punto es el que debe ser mejorado y es en el que se está trabajando con especialistas del KTH-Royal Institute of Technology de Estocolmo para implementarlo en los nuevos algoritmos.
3. **Post-procesado.** Una vez se ha reconstruido el objeto se utilizan el software *inspector-3D* y el software *Amira* para colorear, modificar el tamaño o realizar cualquier tipo de filtrado que se desee para mejorar su visualización.

4. METODOLOGÍA DEL LMA



Figura 4.2: Microscopio TITAN STEM instalado en el LMA. Permite la exploración tomográfica de muestras con $\pm 70^\circ$ de inclinación del eje.

5

Conclusiones

A lo largo de este TFM se han programado algoritmos de reconstrucción tomográfica empleando el teorema de la rebanada. Se ha constatado que la aplicación directa del teorema no produce la nitidez deseada. Se ha mejorado el algoritmo de reconstrucción tomográfica mediante la programación del “backscattering filtrado” en el que se aplican fórmulas de cuadratura teniendo en cuenta el cambio de variable de una malla en polares a una malla en rectangular. Estos algoritmos se basan en considerar que los datos son atenuaciones de rayos al atravesar el objeto y son los tipos de algoritmos empleados en el LMA mediante programas como Inspect3D. Esta interpretación de las proyecciones no es muy realista en el caso de tomografía de electrones para nanopartículas, ya que los fenómenos de difracción son importantes. Se ha expuesto un método de reconstrucción tomográfica que tiene en cuenta los efectos de difracción, se basa en una aproximación a la solución de la ecuación de Schrödinger mediante la primera aproximación de Born.

Como conclusión final consideramos que la calidad de las reconstrucciones tomográficas de nanopartículas en el LMA mejoraría con el empleo de software que tenga en cuenta los efectos difractivos.

Bibliografía

- [1] Bals S 2014 *Colouratoms* disponible en <http://ematweb.uantwerpen.be/colouratoms>
- [2] Cantoni M 2014 *3D Microscopy and FIB Nanotomography* disponible en [http://cime.epfl.ch/files/content/users/120862/files/MSE-704 FIB-NT](http://cime.epfl.ch/files/content/users/120862/files/MSE-704_FIB-NT)
- [3] Duoandikoetxea J 1995 *Análisis de Fourier* (Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana)
- [4] Fanelli D y Öktem O 2008 Electron tomography: a short overview with an emphasis on the absorption potential model for the forward problem *Inverse Problems* **24** 013001
- [5] Kak A y Slaney M 2001 *Principles of Computerized Tomographic Imaging* (Philadelphia, PA: SIAM)
- [6] Kohr H y Louis A 2011 Fast and high-quality reconstruction in electron tomography based on an enhanced linear forward model *Inverse Problems* **27** 045008
- [7] Midgley P y Saghi Z 2012 Electron Tomography in the (S)TEM: From Nanoscale Morphological Analysis to 3D Atomic Imaging *Annu. Rev. Mat. Res.* pp 59-79
- [8] Midgley P y Weyland M 2003 3D electron microscopy in the physical sciences: the development of Z-contrast and EFTEM tomography *Ultramicroscopy* **96** pp 413-431
- [9] Natterer F 1986 *The Mathematics of Computerized Tomography* (New York: Wiley)
- [10] Natterer F y Wübbeling F 2001 *Mathematical Methods in Image Reconstruction* (Philadelphia, PA: SIAM)
- [11] Schoenmakers R y Voorhout W 2003 *Inspect3D Tomography Reconstruction Package. Step-by-Step Guide Version 2.1* (FEI Company)
- [12] Tendeloo G 2014 *Counting Atoms in nanomaterials* disponible en <http://countatoms.emat.uantwerpen.be/countatoms.html>

BIBLIOGRAFÍA

- [13] Williams D y Carter C 2009 *Transmission electron microscopy* (New York: Springer)