

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**Remoción de la aberración cromática lateral en  
imágenes de microscopía óptica de campo claro**

Tesis que presenta

**Miguel Angel Guzmán Altamirano**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias Aplicadas**

en la opción de

**Nanociencias y Nanotecnología**

**Director de la Tesis:**

Dr. Braulio Gutiérrez Medina.

**San Luis Potosí, Noviembre del 2015**



## Constancia de aprobación de la tesis

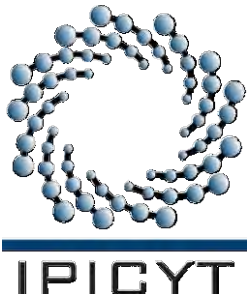
La tesis "*Remoción de la aberración cromática lateral en imágenes de microscopía óptica de campo claro*" presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Aplicadas en la opción de Nanociencias y Nanotecnología fue elaborada por **Miguel Ángel Guzmán Altamirano** y aprobada el **trece de noviembre de dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**  
Director de la tesis

**Dr. Miguel Avalos Borja**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Héctor Octavio González Ochoa**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dra. Olga Araceli Patrón Soberano**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de biofísica de la División de Materiales Avanzados para la Tecnología Moderna del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Braulio Gutiérrez Medina.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP, convenio ITESI-002) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 042 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias Aplicadas en la opción de Nanociencias y Nanotecnología está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de noviembre del año 2015, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Braulio Gutiérrez Medina</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Miguel Avalos Borja</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Héctor Octavio González Ochoa</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UdG</b>
<b>Dra. Olga Araceli Patrón Soberano</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCION DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

sustentó el C.

**Miguel Angel Guzmán Altamirano**

sobre la Tesis intitulada:

*Remoción de la aberración cromática lateral en imágenes de microscopía óptica de campo claro*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**

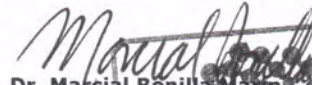
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 17:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de noviembre de 2015.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Manríquez**  
Secretario Académico



Mi principal agradecimiento es para el Dr. Braulio Gutiérrez Medina por su apoyo y paciencia (bastante diría yo), a mi comité tutorial conformado: el Dr. Miguel Avalos Borja (DMAv), la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano (DBM) y el Dr. Héctor Octavio González Ochoa (CUCEI) por sus observaciones y tiempo dedicado hacia mi persona.

De igual manera quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio de biofísica: Gamaliel, Noemí, Mónica Noemí, Mónica, Paola y Manuel.

No puedo dejar de mencionar a todos y cada uno de los investigadores y compañeros de la División de Materiales Avanzados

Al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por todas las facilidades y atenciones otorgadas.

# Contenido

## Capítulo 1

Principios de microscopía digital	5
1.1 Microscopía óptica.	5
1.1.1 El microscopio de campo claro	5
1.1.2 El microscopio de campo oscuro	11
1.1.3 El microscopio de luz polarizada	12
1.1.4 El microscopio de contraste de fase	13
1.1.5 El microscopio de fluorescencia	17
1.1.6 El microscopio confocal	19
1.1.7 Defectos en las imágenes de los sistemas de microscopía	21
1.2 Procesamiento digital de imágenes	24
1.2.1 Espacios de color	26
1.2.2 Interpolación cromática	30
1.2.3 Herramientas matemáticas utilizadas en el procesamiento digital de imágenes.	30
1.2.4 Técnica de agrupación K-means	34

## Capítulo 2

Construcción de un sistema de barrido láser	37
2.1 Microscopio de campo claro invertido	38
2.1.1 Sistema de iluminación	39
2.2 Caracterización del láser He-Ne	43
2.2.1 Estabilidad de la intensidad del láser	43
2.2.2 La cintura ( $w_0$ ) del láser	46
2.2.3 Magnificación de la cintura $w_0$ del láser	48
2.3 Sistema de barrido láser	51
2.3.1 Caracterización del PSD	52
2.3.2 Caracterización de los galvanómetros	53
2.3.3 Barrido del láser en el plano de la muestra	57
2.4 Prueba de desempeño del sistema de barrido con PID	59
2.5 Sistema de microscopía confocal	61

Capítulo 3	
Remoción de la aberración cromática lateral en imágenes de microscopía de campo claro	65
3.1 Desarrollo del método de corrección de la ACL	67
3.1.1 Construcción del sistema experimental	67
3.1.2 Calibración del sistema experimental	69
3.1.3 El algoritmo de corrección	71
3.2 Pruebas experimentales de la remoción de la ACL en campo claro	72
3.2.1 El perfeccionamiento en la definición de los límites de los elementos de una imagen	72
3.2.2 Evaluación cuantitativa de los niveles de reducción de la ACL	73
3.2.3 Registro fiel de contenido de color	74
3.2.4 Incremento en la exactitud en las mediciones de morfología	78
Capítulo 4	
Conclusiones	81

## Lista de figuras

Figura 1.1 Esquema del microscopio de campo claro	6
Figura 1.2. Método de iluminación Köhler	7
Figura 1.3 La lente objetivo del microscopio	10
Figura 1.4 Esquema del microscopio de campo oscuro	11
Figura 1.5 El microscopio de luz polarizada	12
Figura 1.6 Principio del contraste de fase	14
Figura 1.7 El microscopio de contraste de fase	16
Figura 1.8 El microscopio de fluorescencia	18
Figura 1.9 Principio de operación microscopio confocal	19
Figura 1.10 Sistema confocal con iluminación láser	21
Figura 1.11 La aberración cromática	23
Figura 1.12 Ejemplo de una imagen digital	25
Figura 1.13 Filtro de color de Bayer	26
Figura 1.14 Espacios de color	28
Figura 1.15 El proceso de interpolación cromática	31
Figura 1.16 La vecindad entre las posiciones de una imagen	33
Figura 2.1 Sistema mínimo del microscopio de campo claro invertido	39
Figura 2.2 Diagrama esquemático del control electrónico de corriente	41
Figura 2.3 Caracterización del sistema PID	42
Figura 2.4 Caracterización de la estabilidad de la intensidad del láser	46
Figura 2.5 Perfil gaussiano de un haz láser	47
Figura 2.6 Cálculo de $w_0$ con la técnica del filo de la navaja	48
Figura 2.7 Arreglo del telescopio de Kepler	50
Figura 2.8 Sistema de traslación XY para la caracterización del PSD	52
Figura 2.9 Caracterización del sensor PSD	53
Figura 2.10 Galvanómetros de bajo rendimiento	54
Figura 2.11 Arreglo óptico para caracterizar el ángulo de rotación $\Phi$	55
Figura 2.12 Relación de la posición en el PSD vs la corriente $I_{GALVO}$	56
Figura 2.13 Conjugación óptica del eje del barrido	58
Figura 2.14 Prueba experimental del barrido láser	59
Figura 2.15 Mapas de posición del barrido láser	60



Figura 2.16 Sistema mínimo de microscopía confocal	61
Figura 3.1 Estrategia para eliminar la ACL	68
Figura 3.2 La magnitud evaluada de ACL en nuestro microscopio	70
Figura 3.3 Evaluación de los factores de corrección de la ACL	71
Figura 3.4 Efectos de la corrección de ACL en los límites de objetos	73
Figura 3.5 Evaluación cuantitativa de la ACL	74
Figura 3.6 Seccionamiento de las imágenes	76
Figura 3.7 Cuantificación del color	77
Figura 3.8 Segmentación de color	78
Figura 3.9 Análisis cuantitativo de los resultados de segmentación	79

## Resumen

En este documento se presenta el desarrollo de un método para reducir la aberración cromática lateral basado en la técnica de ajuste digital de imagen o *image warping* en imágenes capturadas de un microscopio de campo claro de grado estudiantil.

Previo a la descripción del trabajo principal se relata el desarrollo de un sistema de control de barrido láser en el que se utilizan espejos galvanométricos de bajo costo. Se muestra el diseño, la implementación y la caracterización del control electrónico del sistema en una configuración Proporcional-Integral-Derivativo, lo que mejora substancialmente la posición del haz en el plano de incidencia de un sensor de posición de cuatro cuadrantes al realizar un barrido del haz en él.

En la segunda parte presentamos una alternativa eficiente para eliminar la aberración cromática lateral en imágenes de microscopía de campo claro. Nuestro procedimiento se basa en la calibración de error usando la adquisición secuencial de imágenes con iluminación de diferentes longitudes de onda, y la corrección del error a través de la técnica de image warping. El cálculo de los desplazamientos de marcas fiducias en los canales rojo y verde respecto al canal azul proporcionaron los factores de calibración que se utilizaron posteriormente en imágenes de prueba para ajustar digitalmente los canales de color. Demostramos la mejora cuantitativa en la posición y límites de los objetos en imágenes con iluminación blanca, y además en el contenido de color en muestras biológicas con tinción. Los resultados muestran una reducción del contenido de aberración cromática en el eje-X desde 0.7% hasta 0.09% y en el eje-Y desde 0.71% hasta 0.03%, en ambos casos por debajo del nivel de 0.1%.

### Palabras Clave

Microscopía óptica, Microscopía Confocal, Procesamiento digital de imágenes, Aberración cromática

## **Abstract**

Here we present the development of a method to reduce lateral chromatic aberration in captured images of a student grade bright field microscope. Prior to the description of the main job, we show the development of a scanning laser control system using low-cost galvanometric mirrors. We present the design, implementation, and characterization of the electronic control system in a proportional-integral-derivative configuration, substantially improving the position of the beam in the plane of incidence of a four quadrants position sensor to perform a scan of light on it.

In the second part, we present an efficient alternative to remove lateral chromatic aberration (LCA) in bright field light microscopy images. Our procedure is based on error calibration using time-sequential acquisition at different wavelengths, and error correction through digital image warping. Measurement of the displacements of fiducial marks in the red and green images relative to blue provide calibration factors that are subsequently used in test images to realign color channels digitally. We demonstrate quantitative improvement in the position and boundaries of objects in target slides and in the color content and morphology of specimens in stained biological samples. Our results show a reduction of LCA content on the X-axis from 0.7% to 0.09% and on the Y-axis from 0.7% to 0.03%, in both cases below the 0.1% level.

### **KEY WORDS**

Optical microscopy, Confocal microscopy, Digital image processing, Chromatic aberration

## Introducción

El microscopio óptico se ha utilizado como una herramienta fundamental para proporcionar imágenes magnificadas de objetos imperceptibles a simple vista. Una imagen óptica es una representación discreta de distribución de intensidades en una superficie hacia la cual se dirigen los rayos que derivan de un objeto iluminado tras interactuar con un sistema óptico [1]. El resultado de la interacción de la luz con la muestra y su entorno es impreso en la imagen, ésta provee información sobre la estructura de la muestra como su morfología y distribución espacial. El análisis y estudio de esta información abre la posibilidad de determinar algunas propiedades físico-químicas de las muestras [2, 3] y su contribución en otros procesos del ambiente en el que están relacionados.

El microscopio óptico de campo claro se ha utilizado como herramienta de análisis en aplicaciones biológicas como la clasificación de células [4], estudios de tráfico intracelular de moléculas [5], el análisis histológico para detectar defectos en células humanas [6], etc. Una de las limitaciones de esta técnica es la dificultad para formar imágenes de muestras muy delgadas, por tal razón se han desarrollado otras técnicas de iluminación que compensan este tipo de limitaciones como la microscopía de contraste de fase [7], la microscopía de campo oscuro [8, 9], la microscopía de fluorescencia [10] y la microscopía confocal [11-16], entre otras.

En la actualidad, el registro de las imágenes provenientes de un sistema de microscopía óptica se realiza con cámaras digitales con el fin de almacenarlas y realizar su posterior análisis en computadora [17, 18]. Una imagen es útil si tiene como característica principal que se aproxime a una copia fiel del objeto real, pero esto en la práctica no se logra, ya que las imágenes son distorsionadas por errores inducidos por el propio instrumento (incluyendo la cámara) y/o por el medio donde se realiza la observación [19].

Un ejemplo de las distorsiones presentes en las imágenes es la aberración cromática (AC), la cual se define como la distorsión de una imagen, creada por un sistema óptico, ocasionada por el hecho de que rayos correspondientes a diferentes longitudes de onda viajan en el sistema óptico siguiendo diferentes trayectorias [20].

La AC se manifiesta en una imagen formando fronteras de colores en los objetos presentes en ella, modificando su morfología general y además disminuyendo su calidad [21].

Para corregir las aberraciones y mejorar la nitidez de las imágenes se han desarrollado distintas metodologías que se pueden clasificar en 2 grupos relevantes:

- a) *Por hardware*, en el que se contempla el uso de elementos ópticos que logran un grado de corrección alto de las aberraciones. Sin embargo esta opción es por lo general de alto costo económico e incrementa el tamaño de los sistemas.
- b) *Por software*, en donde se usan un conjunto de técnicas de procesamiento de imágenes con el objetivo de lograr que a partir de una imagen original se obtenga otra en donde el efecto de las aberraciones se reduzca y, por consecuencia, la imagen sea más confiable como herramienta analítica.

La microscopía óptica es útil en los distintos campos en donde interviene como herramienta de análisis. La calidad de las imágenes es un factor importante por la variedad de información que proporciona. Es entonces deseable el desarrollo de nuevas técnicas de iluminación y el perfeccionamiento de las técnicas existentes para incrementar la calidad de las imágenes.

### **Objetivo**

Desarrollar 2 metodologías específicas que contribuyan a obtener imágenes de alta calidad en sistemas de microscopía óptica. El primer método implicó diseñar y construir un sistema de barrido láser con un controlador Proporcional-Integral Derivativo (PID) para su uso en sistemas de microscopía confocal. El segundo consistió en desarrollar un programa computacional para la corrección de la aberración cromática en imágenes que se obtienen de un microscopio de campo claro.

## **Contenido del texto**

El Capítulo 1 contiene los fundamentos teóricos que sustentan el trabajo. En particular, se revisan los temas de microscopía óptica, formación de imágenes digitales y métodos elementales de procesamiento digital de imágenes. En el Capítulo 2 se describe el diseño, la construcción y la caracterización de un sistema de control electrónico tipo PID que se integró en un sistema de barrido de un haz láser. Finalmente, en el Capítulo 3 se muestra el desarrollo de un método para corregir la aberración cromática lateral en imágenes capturadas en un microscopio de campo claro de grado estudiantil.



# Capítulo 1

## Principios de microscopía digital

En este capítulo se describen los fundamentos de algunas técnicas de iluminación de microscopía óptica, iniciando con una descripción del microscopio de campo claro y sus componentes. Se hace una revisión sobre las técnicas campo oscuro, luz polarizada, contraste de fase y confocal con el fin de exponer sus principios de operación y las características que resaltan en las imágenes.

Por último, se realiza un resumen sobre la metodología del procesamiento digital de imágenes, desde la formación de una imagen digital hasta el uso de operaciones matemáticas para mejorar la nitidez y resaltar características útiles para diversos análisis y estudios.

### 1.1 Microscopía óptica.

La microscopía óptica es un conjunto de técnicas y métodos para formar imágenes magnificadas de objetos pequeños para su análisis o estudio utilizando para ello la luz. La técnica más popular es la microscopía de campo claro, la cual se describe a continuación.

#### 1.1.1 El microscopio de campo claro

En la Figura 1.1a se muestra el esquema del microscopio de campo claro, cuyo principio de operación es el siguiente: la luz que emite la fuente de iluminación del microscopio es ópticamente conjugada con en el plano de la muestra a través las lentes del colector y el condensador. Una vez que la luz interacciona con la muestra, la luz reemitida por ella se conjuga ópticamente con el plano del observador para formar la imagen muestra, empleando para ello la lente objetivo (llamada comúnmente objetivo) y la lente ocular (ocular). La imagen de la muestra en el plano del observador es magnificada y el grado de aumento es caracterizado por el factor de aumento total (MT). El MT está determinado por el factor de amplificación proporcionado por el objetivo ( $M_{OBJ}$ ) y por el ocular ( $M_{OC}$ ), mediante la ecuación:  $MT = M_{OBJ} * M_{OC}$ . Como se observa en la Figura 1.1b, el objetivo forma la imagen intermedia de la muestra a una distancia conocida como la longitud de tubo del



microscopio (LT); esta posición ubica a la imagen a una distancia menor ( $S_i$ ) a la distancia focal del ocular ( $f_{oc}$ ). Con este arreglo se forma una imagen virtual de la muestra, situada a 25 cm de observador (punto cercano).

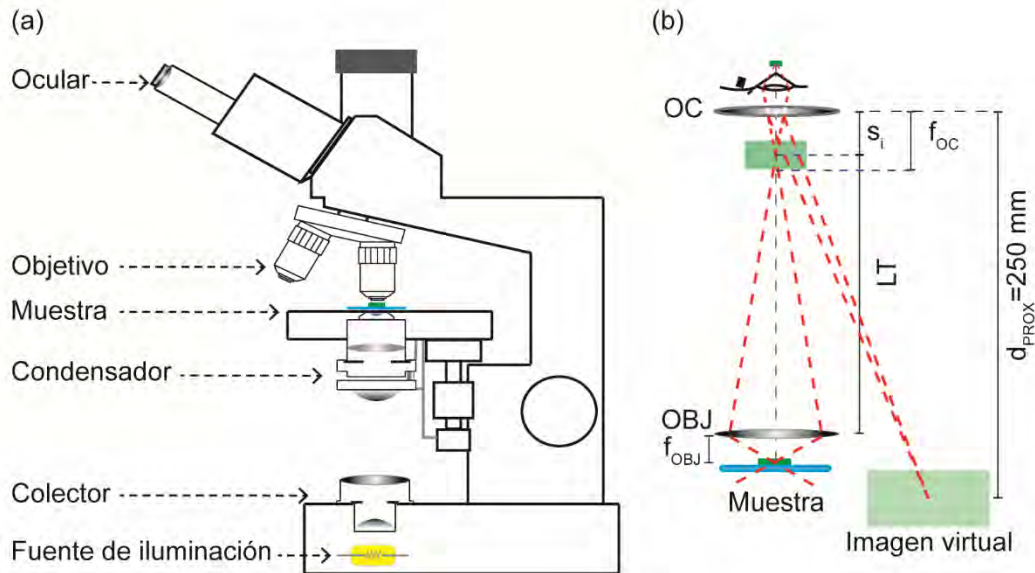


Figura 1.1 Esquema del microscopio de campo claro. (a) El plano de la fuente de iluminación se conjuga ópticamente con el plano de la muestra a través el arreglo óptico que forma el condensador y el colector. La luz reemitida por la muestra se conjuga ópticamente con el plano del observador mediante el objetivo (OBJ en la figura b) y el ocular (OC en la figura b). (b) El sistema óptico del microscopio forma una imagen virtual de la muestra a 25 cm del observador.  $f_{OBJ}$ : distancia focal del objetivo,  $f_{oc}$ : distancia focal del ocular,  $s_i$ : distancia entre la imagen de la muestra y el ocular, LT: longitud del tubo,  $d_{PROX}$ : Distancia del punto cercano.

### ***La iluminación del microscopio de campo claro***

La correcta iluminación de una muestra juega un papel crítico en la formación de su imagen, ya que una distribución de intensidades no homogénea espacialmente provoca o acentúa señales de ruido en ella, lo que contribuye a reducir su calidad [22, 23].

Los métodos principales para estructurar la iluminación en campo claro son:

- La iluminación crítica o Nelsoniana. En esta configuración el plano de la fuente de iluminación se conjuga ópticamente con el plano de la muestra, para proporcionar una iluminación que resalte el contraste en las imágenes.

Este método tiene como desventaja la falta de uniformidad en la iluminación en el campo visual y el traslape de la imagen de la fuente de luz en el plano de la muestra. Para reducir el efecto del traslape se utiliza un difusor de luz en la fuente [24].

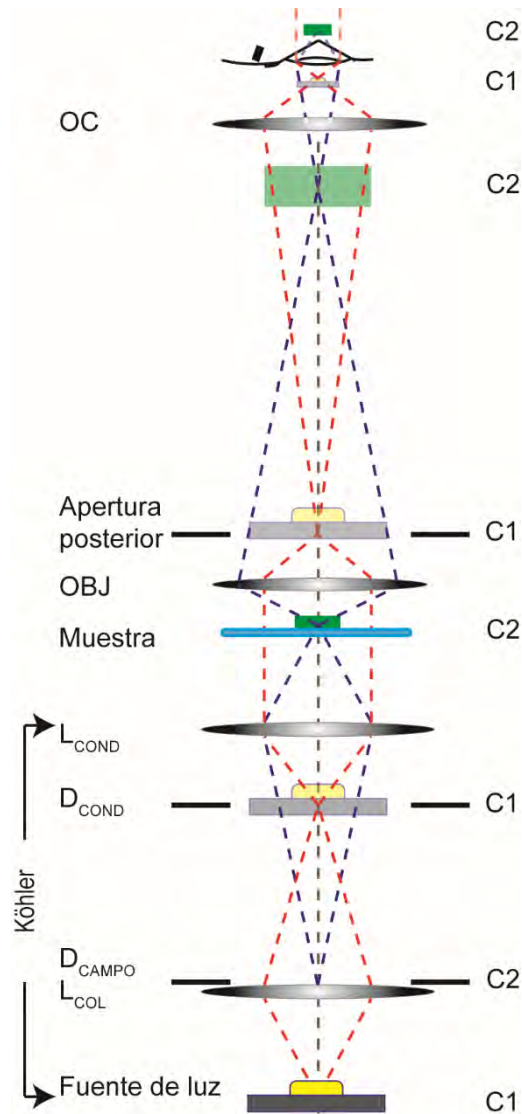


Figura 1.2. El método de iluminación Köhler en el que se forman 2 grupos de planos ópticamente conjugados para iluminar el campo visual de la muestra. El conjunto C1 ilumina el campo de visión del objetivo y ajusta el tamaño del mismo con  $D_{CAMPO}$ . El conjunto C2 ilumina el plano de la muestra y controla el contraste de la imagen con  $D_{COND}$ . Este arreglo no permite que la imagen de la fuente de iluminación se conjugue en el plano de la muestra.

- La iluminación Köhler. A diferencia de la iluminación crítica, forma 2 conjuntos de planos ópticamente conjugados C1 y C2 (véase la Figura 1.2b) para

iluminar homogéneamente en el campo visual de la muestra sin que la imagen de la fuente interfiera con el plano de la muestra [25]. El conjunto de planos C1 tiene como punto de inicio la fuente de iluminación (la cual es ópticamente conjugada con el foco de la lente condensadora,  $L_{COND}$ ) formando un frente óptico plano que emerge de la apertura de salida de  $L_{COND}$  y a su vez forma el campo de iluminación de la muestra. El área del campo de iluminación puede ajustarse con el diafragma de campo ( $D_{CAMPO}$ ). C1 también es ópticamente conjugado en la apertura trasera del objetivo y en el foco del observador (ojo humano, cámara o sensor óptico) a través del ocular (OC) evitando que se forme la imagen de la fuente de iluminación en el plano del observador.

El conjunto C2 corresponde al plano del diafragma de campo ( $D_{CAMPO}$ ) o la apertura de salida de  $L_{COL}$ , que actúa como una fuente virtual de iluminación y es ópticamente conjugado con el plano de la muestra, el plano de la imagen intermedia del objetivo y el plano del observador. El frente de onda que incide en la muestra (C2) es distinto al del campo visual (C1), por lo que el contraste de la imagen se controla de manera independiente con el diafragma del condensador ( $D_{COND}$ ).

En este método la intensidad lumínica del campo visual es más homogénea en comparación a la iluminación crítica ya que el haz de luz emergente del condensador está colimado. Además, el área se puede ajustar al tamaño del campo visual del objetivo, condición que reduce los reflejos inducidos por la iluminación de un área mayor al del campo visual.

La luz que provee cualquiera de estos métodos incide sobre la muestra difractándose y es colectada por el objetivo, el cual define la calidad de las imágenes y se describe a continuación

### ***El objetivo del microscopio***

El objetivo del microscopio es considerado el elemento más importante de un sistema de microscopía óptica ya que proporciona el factor de magnificación principal ( $M_{OBJ}$ ) de la imagen, define el valor máximo de contraste y reduce de

manera significativa las aberraciones [26]. El grado de corrección en los objetivos depende del sistema óptico añadido en su estructura así como del tipo de lentes utilizados en su construcción. Existen objetivos que realizan la corrección de la AC para el rojo y el azul (hablando del color de la luz o su longitud de onda), además de realizar la compensación de la aberración esférica (AE) para el verde, este tipo de objetivos se conocen como objetivos acromáticos. Los objetivos semi-apocromáticos corrigen la AC para el rojo, el azul y en cierto grado al verde, en el caso de la AE se corrige para el verde y el azul. Los objetivos que poseen un mayor nivel de corrección de aberraciones son los apocromáticos que corrigen la AC para 4 colores: el azul oscuro, el azul, el rojo y el verde; mientras que la corrección de la AE es para dos o tres colores. Los tres tipos de objetivos proyectan imágenes con curvaturas y al corregirse para este defecto se denominan plan-acromáticos, semi-plano acromáticos o plan-apocromáticos.

El rango de ángulos para los cuales el objetivo acepta luz, están representados por un número adimensional que se conoce como la apertura numérica (*numerical aperture* o NA) y se determina con la siguiente expresión.

$$NA = n \sin \theta \quad (1.1)$$

Donde  $n$  es el índice de refracción del medio en el que la lente se encuentra y  $\theta$  es la mitad del ángulo del cono máximo de luz que puede entrar al objetivo con referencia a un punto o un objeto que se observa.

El campo visual del objetivo está también definido por un número y se conoce como número de campo (*field number* o fn) con el cual se puede conocer el tamaño de campo en el plano de la muestra con la ecuación

$$tc = fn / M \quad (1.2)$$

donde  $tc$  es el tamaño del campo visual en el plano de la muestra y  $M$  es factor de magnificación de objetivo.

De acuerdo a las necesidades del diseño, los objetivos pueden configurarse para que formen una imagen real e invertida a 160 mm después de la apertura trasera del objetivo (óptica finita), esta imagen se conoce como imagen intermedia. En otros

casos los objetivos pueden configurarse con corrección al infinito, permitiendo colocar distintos elementos ópticos después de la apertura trasera sin restricción de espacio (óptica infinita), la imagen de un objetivo con corrección al infinito se forma después de colocar una lente convergente al final del sistema óptico. La información de estos parámetros de operación se encuentra impresa en el cuerpo del objetivo como se representa en la Figura 1.3.

Otra propiedad que depende del objetivo es el poder de resolución del microscopio que está definido por la ecuación:

$$\delta = \frac{1.27\lambda}{(NA_{OBJ} + NA_{COND})} \quad (1.3)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la fuente de iluminación,  $NA_{OBJ}$  corresponde a la apertura numérica del objetivo y  $NA_{COND}$  a la apertura numérica del condensador. La máxima resolución del microscopio se obtiene cuando la apertura numérica de ambos elementos es igual [22, 27].

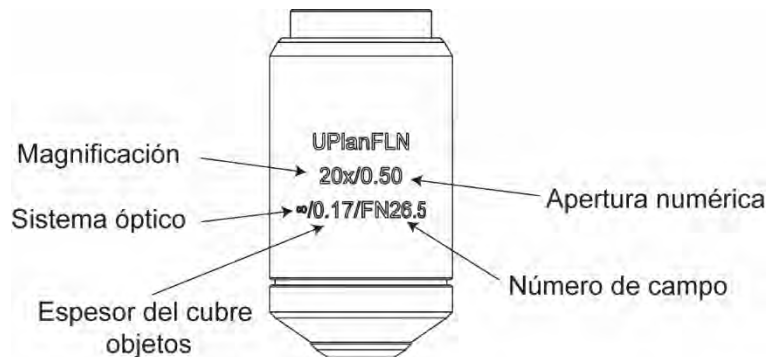


Figura 1.3 La lente objetivo del microscopio. Considerado como el elemento de mayor importancia en un microscopio tiene varias propiedades que definen su capacidad operativa y por lo general están impresas en su cuerpo, la descripción de algunas de estas características se encuentra en el texto.

### **El ocular**

Para conjugar ópticamente el plano la imagen intermedia del objetivo con el plano del observador se utiliza la lente ocular que proporciona un factor de magnificación adicional al objetivo (4x, 10x, 15x o 20x) y en algunos casos aporta un factor corrección de la AC y la AE. Una lente ocular del tipo Abbe no proporciona

corrección cromática ni de esfericidad, un ocular aplanar corrige la AE y un ocular aplanar-cromático corrige la AE y la AC lateral para el color rojo y azul.

Los elementos que hemos descrito en esta sección constituyen la base del sistema óptico del microscopio de campo claro; pero también para implementar otras técnicas de iluminación distintas mediante modificaciones en su estructura o añadiendo otros elementos ópticos, como se describe en las siguientes secciones.

### 1.1.2 El microscopio de campo oscuro

La técnica de iluminación de campo oscuro se usa para incrementar el contraste de las imágenes y consiste en generar una trayectoria inclinada de la iluminación formando un cono de luz con el centro oscuro. En ausencia de un objeto en el plano de la muestra que difracte la luz, el cono oscuro cubrirá la apertura frontal del objetivo creando un fondo negro en el campo visual (Figura 1.4a). El cono de luz garantiza que solamente la luz difractada de la muestra sea la que se propague al objetivo, véase la Figura 1.4b. Como resultado se forma una imagen de objetos luminosos con un fondo oscuro (Figuras 1.4c, d).

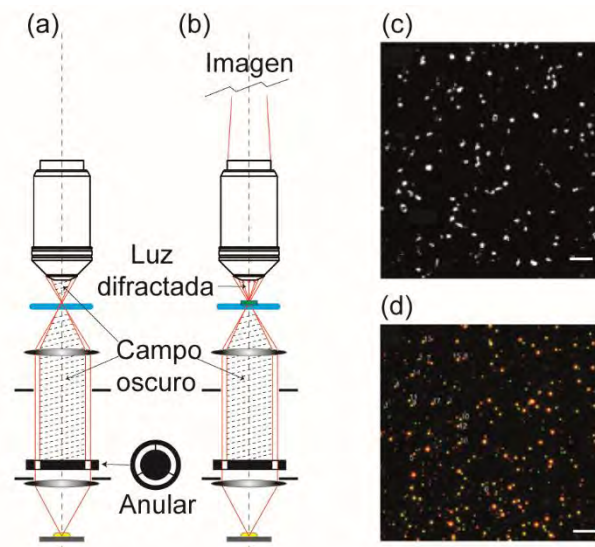


Figura 1.4 Esquema del microscopio de campo oscuro. (a) En esta técnica de iluminación se coloca un diafragma anular en el camino óptico del sistema de iluminación formando un haz de luz con el centro oscuro. Al enfocarse el haz en el plano de la muestra y propagarse hacia el objetivo se forma un cono de luz cuyo centro oscuro cubre la apertura frontal del objetivo. (b) Al colocar una muestra, solamente la luz difractada por ella es recolectada por el objetivo

para formar una imagen. Las imágenes proporcionadas por este sistema tienen un fondo negro y los objetos poseen un contraste alto como lo muestran la imagen de células HUVEC en (c) y la imagen de nanodiscos de oro –AuNP/25- en (d). Imágenes modificadas de [8, 28]. La escala de las barra en (c) es 200  $\mu\text{m}$  y la barra en (d) es de 100  $\mu\text{m}$ .

### 1.1.3 El microscopio de luz polarizada

En esta técnica de iluminación se hace uso de la luz polarizada y su interacción con materiales birrefringentes para su análisis y estudio. La luz es una onda electromagnética constituida por un campo eléctrico y uno magnético mutuamente perpendiculares los cuales oscilan al propagarse espacialmente. Una fuente común de luz emite ondas cuyos vectores de campo eléctrico y magnético no poseen una dirección preferente. A esta clase de luz se le denomina luz no polarizada [29, 30]. Cuando la luz se propaga por un filtro polarizador lineal, este bloquea todas las componentes del campo electromagnético excepto una, que es paralela al eje polarización del filtro, generando una forma de luz polarizada linealmente. La birrefringencia es la propiedad óptica que poseen algunos materiales de contar con 2 índices de refracción según la dirección cristalográfica en la que se propaga la luz a través de ellos.

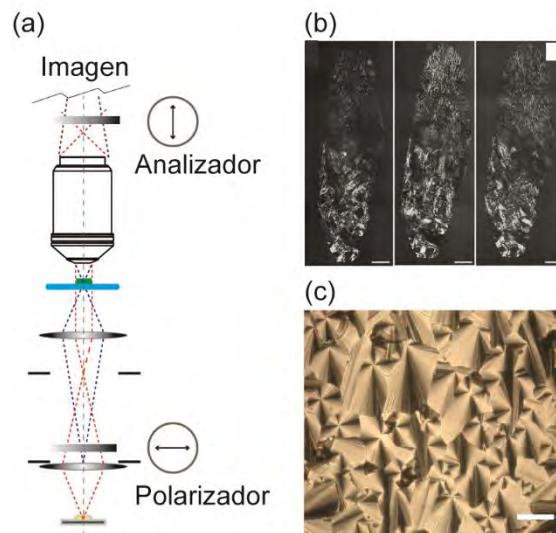


Figura 1.5 El microscopio de luz polarizada. (a) El principio básico de este tipo de microscopio es un arreglo polarizador-analizador para detectar materiales con la propiedad óptica de birrefringencia, (b) ejemplo de ello es el colageno presente en el cartilago humano [31] y (c) las nanopartículas de plata orientadas formado conos característicos de su estructura en bulto [32]. La barra de escala en (b) es de 250  $\mu\text{m}$  y en (c) es de 100  $\mu\text{m}$ .

La velocidad de propagación de la luz de dichos materiales, también llamados anisotrópicos, es diferente según la orientación de su arreglo molecular, en la mayoría de los casos su estructura cristalográfica resulta en la existencia de 2 orientaciones con velocidades distintas de propagación de luz. Como el índice de refracción representa el cociente entre la velocidad de una onda electromagnética en el vacío y en la materia, entonces este tipo de materiales presentan dos índices de refracción o birrefringencia [31, 33]. Los materiales birrefringentes tienen la propiedad de desdoblar la luz incidente no polarizada en 2 rayos linealmente polarizados y perpendiculares entre sí, o en el caso de la incidencia de luz linealmente polarizada el material puede modificar su estado de polarización.

En la Figura 1.5a se muestra un esquema del microscopio de luz polarizada, en el cual se utiliza un arreglo óptico polarizador-analizador [34]. Cuando tenemos una fuente de luz no polarizada y se propaga a través del primer filtro polarizador lineal (polarizador) solamente las componentes de la luz que son paralelas al eje de polarización serán transmitidas generando un haz linealmente polarizado. Como el eje transmisión del analizador (segundo filtro polarizador en el camino óptico del sistema) es perpendicular al eje del polarizador, al incidir la luz polarizada que proviene del polarizador es bloqueada. Al colocar una muestra birrefringente entre los filtros esta modificará el estado de polarización de la luz incidente en ella, permitiendo que cierta porción o la totalidad de la luz se propague a través del analizador de acuerdo a la ley de Malus, la cual relaciona la intensidad de la luz polarizada linealmente y el ángulo que forma el plano de polarización del haz incidente con el eje de polarización del filtro. La imagen entonces se forma con la luz que emerge del arreglo polarizador-analizador.

#### **1.1.4 El microscopio de contraste de fase**

En un microscopio de contraste de fase se aprovecha el hecho de que las muestras, en general, tienen un índice de refracción distinto al del sistema óptico, induciendo un cambio de fase entre la onda de luz que proviene de la fuente (onda envolvente **S**) y la que es difractada por la muestra (onda difractada **D**). El contraste se define como el cambio de intensidad entre las zonas vecinas en una imagen, esta característica define las fronteras entre los distintos objetos presentes en una



imagen. En esta técnica se modifica intencionalmente la diferencia de fase entre **S** y **D** para incrementar el contraste en la imagen. Con el fin de describir el principio de operación mediante un ejemplo se considera que la onda envolvente está definida por  $S = E_0 \text{sen}(wt)$  y la onda difractada por  $D = k_a E_0 \text{sen}(wt - \varphi)$ .  $E_0$  es el máximo valor del campo eléctrico,  $k_a$  el factor de atenuación de la muestra y  $\varphi$  es el desfase que sufre **D** respecto a **S** cuando está presente la muestra en el campo visual del microscopio.

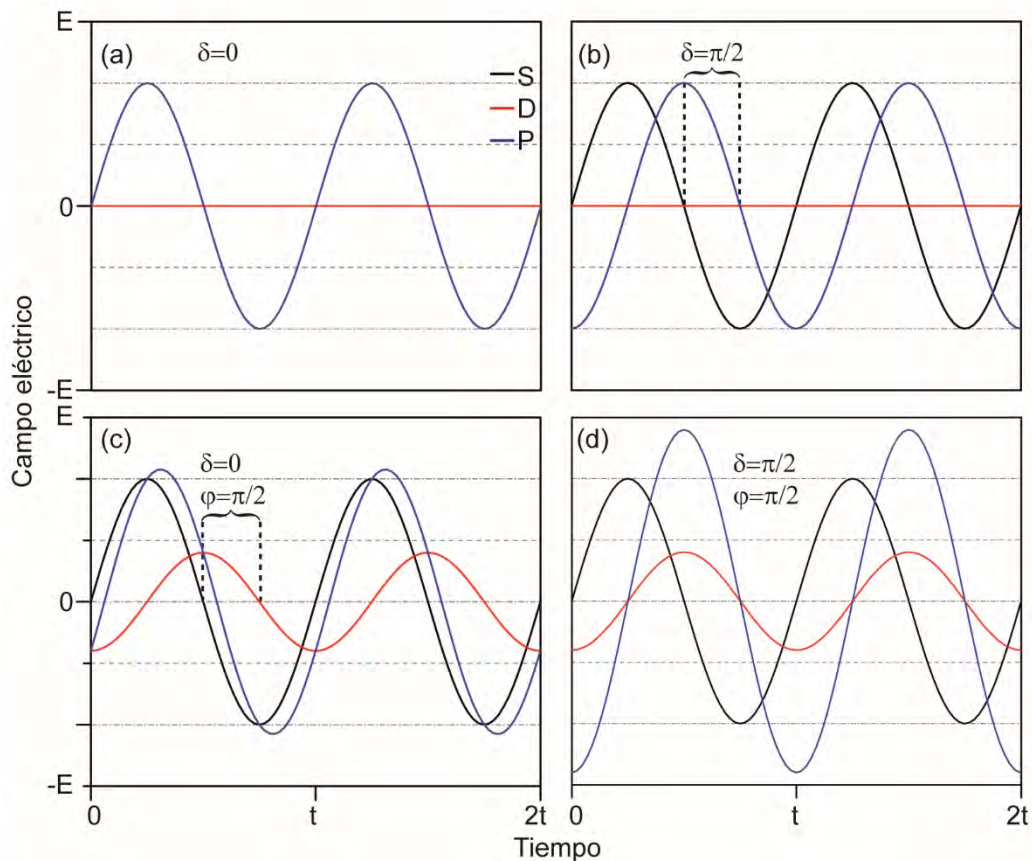


Figura 1.6 Principio del contraste de fase. Cuando un frente de luz que se propaga en el plano de la muestra se aleja de ella, se considera que esta formado por 3 componentes: La onda envolvente **S** (línea negra) que es la frente de luz incidente en el plano de la muestra pero no interactúa con ella, el frente de onda difractado **D** (línea roja) que interactúa con la muestra y el frente de onda resultante **P** (línea azul) de la relación  $P=S+D$ . En (a) la componente **P** tiene la misma amplitud que **S** y la misma fase ya que no existe retardo en la fase de la onda envolvente. En (b) está presente la lamina de retardo ( $\delta = \pi/2$ ) lo que hace que **P** posea la misma amplitud de **S** pero con retraso de su fase de  $\pi/2$ . En (c) se muestra el caso donde

esta presente la muestra y la componente **D** se retrasa por  $\varphi = \pi/2$ , la onda resultante **P** es mayor en amplitud con un retardo de fase respecto a **S**. (d) Cuando se retarda la fase de **S** por un factor de  $\delta = \pi/2$  la amplitud de **P** se incrementa aun mas asi como su fase es modificada respecto a **S**.

Para este ejemplo fijamos este valor en  $\delta = \pi/2$ . También se contempla el efecto de una lámina de retardo que se ubica después del plano de la muestra con un retardo de fase de  $\varphi = \pi/2$  que se aplica sobre la onda **S**.

Después de que las ondas **S** y **D** se alejan del plano de la muestra son colectadas por el objetivo y enfocadas en el plano de la imagen intermedia combinandose por interferencia óptica y produciendo un frente de onda **P** cuya representación matemática esta dada por la ecuación  $P=S+D$ . La imagen intermedia depende entonces de la ponderación de las amplitudes de las ondas **D** y **S** además de la diferencia relativa de la fase entre ellas [35, 36].

En la Figura 1.6 se muestra la simulación de 4 casos que ejemplifican el corrimiento de fase entre las ondas **D** y **S**, y su efecto en la onda resultante **P**. La línea negra corresponde a la componente **S**, la línea roja a **D** y la línea azul a **P**. En la Figura 1.6a se exhibe la condición cuando no se encuentra presente un objeto en el plano de la muestra por lo que  $D=0$ , además en este caso se considera que no esta presente la lámina de retardo por lo que **S** se propaga sin alterarse, razón por la cual la onda **P** tiene un valor de  $P = 0 + S = E_0 \text{sen}(wt)$  en el plano de la imagen intermedia. En la Figura 1.6b se considera que no existe una muestra pero esta presente la lamina el retardo ( $\varphi = \pi/2$ ) por lo que  $S = E_0 \text{sen}(wt - \pi/2)$  al propagarse a través de la lámina de retardo haciendo que  $P = 0 + S = E_0 \text{sen}(wt - \pi/2)$ .

En la Figura 1.6c la condición es que esta presente una muestra por lo que  $D = k_a E_0 \text{sen}(wt - \pi/2)$  y la lámina de retardo no se encuentra presente entonces  $P = D + S = E_0 (K_a \cos wt + \text{sen} wt)$ , relación que refleja un incremento en el valor del campo eléctrico de **P** y un corrimiento de fase. En el último caso, Figura 1.6d, se considera que esta presente la muestra y la lamina de retardo por lo que

$P = D + S = E_0([\text{sen}(wt) - \text{cos}(wt)][ka + 1])$  observando que el valor del campo eléctrico se incrementa en  $P$  en una proporción mayor respecto a los casos presentados en las Figuras 1.6a, 1.6b y 1.6c. El resultado final del retardo en la fase provocado por  $\delta$  y  $\varphi$  es un incremento significativo en el contraste de las imágenes mejorando, principalmente, la definición de las fronteras.

En el microscopio de de contraste de fase se utiliza un disco anular para generar un cono de luz con un centro obscuro pero a diferencia de la técnica de campo oscuro el objetivo colecta el cono de luz completo como se muestra en la Figura 1.7a, una lamina de retardo se coloca en la apertura trasera del objetivo afectando solamente a la componente  $S$ . La descripción del principio de operación del microscopio se ajusta a la descripción que se ha hecho previamente. La Figura 1.7b es la imagen de células de tejido humano capturada con un microscopio de contraste de fase, en la cual se observa que las fronteras de las células se encuentran bien definidas lo que permite resaltar su morfología individual. Además esta mejora en el contraste facilita el uso de técnicas de procesamiento digital de imágenes como la segmentación de objetos, veáse la Figura 1.7c.

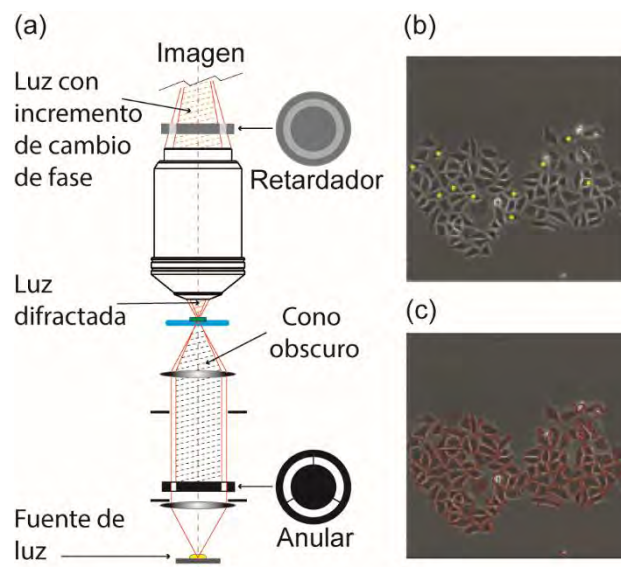


Figura 1.7 El microscopio de contraste de fase. (a) Utiliza un anillo anular y un anillo de retardo con el cual se manipula intencionalmente el desfase que existe entre la luz difractada por la muestra y la luz de la fuente. Esto incrementa el contraste de los objetos presentes en el campo visual del microscopio produciendo imágenes con baja relación

señal/ruido y fronteras bien definidas facilitando procesos como la segmentación de objetos (b y c). Imágenes modificadas de [37]. El tamaño de las imágenes (b) y (c) es de 400 x 400 píxeles.

### 1.1.5 El microscopio de fluorescencia

En un microscopio de fluorescencia se utiliza una fuente de luz con una longitud de onda específica para excitar moléculas y estas, a su vez, responden reemitiendo luz con menor energía que la de excitación. Este fenómeno que se presenta en cierto tipo de moléculas se conoce como fluorescencia del cual hablaremos a continuación.

En la Figura 1.8a se muestra un diagrama para representar los estados electrónicos de una molécula hipotética con un estado basal ( $S_0$ ) y dos de mayor energía ( $S_1$  y  $S_2$ ), a su vez estos niveles cuentan con varios subniveles vibracionales. La gráfica representa la energía relativa de cada nivel electrónico en función del tiempo. Las flechas verticales indican la absorción y/o emisión de energía en forma de fotones y las flechas diagonales negras la disipación de energía principalmente en forma de calor.

Cuando inciden fotones de excitación (flecha azul de la Figura 1.8a) en un átomo o molécula, los electrones de éste ubicados en el estado basal  $S_0$  pueden ser promovidos a un sub-nivel de mayor energía, en  $S_2$  por ejemplo. Una vez que el electrón está en un estado electrónico excitado cede parte de su energía en forma de vibraciones que se distribuyen al resto de la molécula y finalmente es disipada cuando la molécula choca con otras cediéndola en forma de calor. En este sentido al ceder la energía el electrón desciende a subniveles menores. En un momento dado el electrón puede ceder toda su energía súbitamente al caer a un nivel inferior (ej.  $S_0$ ) y emitir gran parte de la energía en forma de un fotón de luz (flecha verde en la Figura 1.8a). Como la energía del fotón emitido es menor al de excitación por la pérdida de energía que sufre en forma de calor, la longitud de onda del fotón de emisión es mayor. Eventualmente todos los electrones en estados excitados caen hasta el estado basal ya sea emitiendo luz o perdiendo energía por procesos no radiativos [38].

En la Figura 1.8b se muestra el diagrama de un microscopio de fluorescencia en el que la luz incide en un filtro óptico (EX) con el fin de seleccionar una longitud de onda como fuente de excitación. La luz resultante incide sobre la muestra con el arreglo del espejo dicroico y el lente objetivo. Los fotones de menor energía reemitidos por la muestra son colectados por el objetivo (OBJ) y enviados al sensor de imagen a través del espejo dicroico y el filtro de emisión (EM) que eliminan de la ruta óptica del sensor la iluminación de excitación.

La técnica de fluorescencia es selectiva por naturaleza, lo que permite localizar e identificar materiales específicos que sean fluorescentes naturales (autofluorescencia) o de modo artificial (etiquetas fluorescentes o fluoróforos).

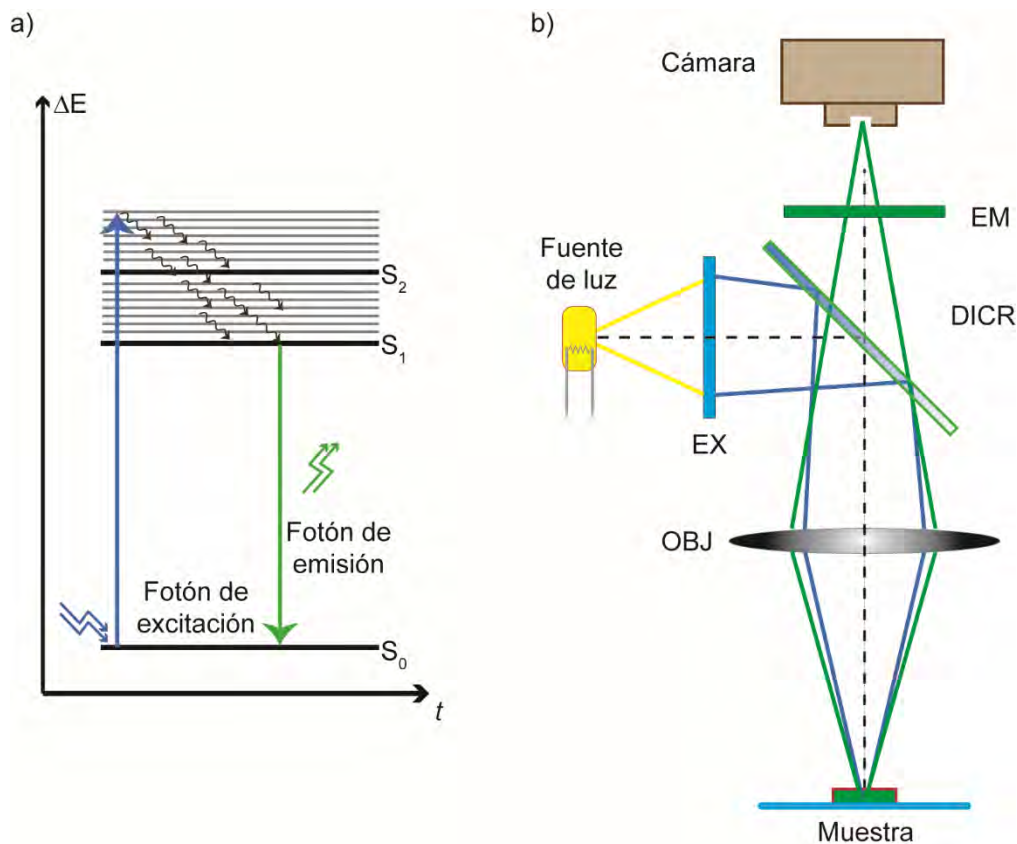


Figura 1.8 El microscopio de fluorescencia. (a) Tiene como principio de operación el fenómeno de fluorescencia presente en moléculas como la fluorita en el cual el material absorbe la energía de un fotón incidente en él y reemite otro fotón de menor energía. (b) El microscopio de fluorescencia aprovecha este fenómeno para analizar muestras de forma selectiva, cuya descripción de su principio de operación se encuentra en el texto. EX: filtro de excitación, EM: filtro de emisión, DICR: espejo dicroico.

### 1.1.6 El microscopio confocal

En la mayoría de las técnicas de microscopía óptica el campo de visión es iluminado simultáneamente como se representa en la Figura 1.9a, por lo que la imagen en el sensor (S) se forma por la contribución de luz del plano enfocado de la muestra (línea roja sólida) y por los planos que no están enfocados (líneas naranjas segmentadas). Al superponerse la luz de todos los planos en el sensor la nitidez de la imagen es reducida. En cambio cuando se incide un haz de luz en una sección pequeña en la muestra, solamente la luz difractada por la sección iluminada es detectada por S. Para asegurar esta condición y además eliminar la contribución de los planos y zonas circunvecinas que no corresponden al sección iluminada se coloca una apertura pequeña (PH) en la parte frontal de S conjugada ópticamente con la sección iluminada, véase la Figura 1.9b.

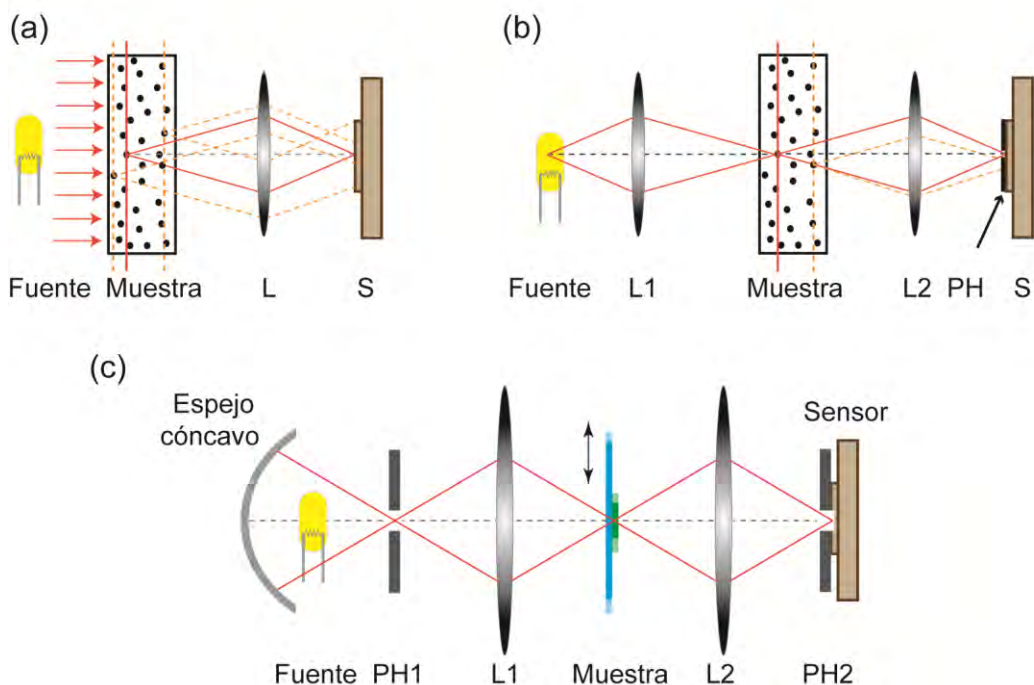


Figura 1.9 Principio de operación microscopio confocal propuesto por M. Minsky. A diferencia de las técnicas tradicionales (a) donde la imagen se forma por la contribución de todos los planos iluminados de la muestra, (b) en la técnica confocal se ilumina una pequeña porción de la muestra y la luz difractada por esta porción es detectada por el sensor (S), la apertura PH elimina la contribución de todas aquellas regiones y planos que no estén ópticamente conjugados con la sección iluminada, la imagen completa se adquiere realizando un barrido del haz de luz en toda la muestra. En (c) se presenta el esquema básico del microscopio

confocal propuesto por Minsky en 1959. L/L1/L2=Lente convergente, PH/ PH1/ PH2: Apertura o pinhole, S: Sensor óptico.

En los años 50 del siglo pasado Marvin Minsky [39] desarrolló el microscopio confocal (Figura 1.9c), cuyo principio de operación se basa en la descripción anterior. La luz emitida por la fuente es concentrada por el espejo cóncavo en la apertura de PH1 el cual genera una sección de luz pequeña que sirve como fuente de iluminación del sistema confocal. PH1 es ópticamente conjugado al plano de la muestra a través de L1, con lo que se ilumina una porción similar en tamaño en la muestra. Después, la luz reemitida por la muestra es conjugada ópticamente con el plano del sensor por L2, donde se ubica una apertura PH2 eliminando todas las componentes de luz que no corresponden a la zona conjugada, esa información es detectada por sensor. La imagen completa se forma cuando la muestra se traslada en el campo de visión para que la luz incida sobre ella y los datos tanto de la luz difractada como su posición se registren y almacenen para su posterior reconstrucción.

Las ventajas del sistema confocal respecto al microscopio de campo abierto son:

- Mejora del contraste en la imagen
- Mejora de la resolución lateral y axial
- Aumento de la relación señal/ruido
- Se eliminan del instrumento los sistemas de corrección de coma óptico, astigmatismo, curvatura de campo, distorsión de campo y la aberración cromática lateral
- Como la información que se recolecta corresponde solamente al plano focal de interés, al recorrer axialmente la muestra se pueden obtener distintos planos que al integrarse en una imagen pueden formar una representación 3D de la muestra

Conforme ha avanzado la tecnología de fabricación de las lentes y los sistemas de iluminación se han realizado modificaciones a la estructura básica del



microscopio confocal como la integración de una fuente de luz con un sistema láser, véase la Figura 1.10.

Las ventajas que se obtienen al utilizar el sistema láser como fuente de iluminación son que las características intrínsecas de coherencia, bajo nivel de divergencia y monocromaticidad facilitan el crear un tamaño de área de luz incidente lo más pequeño posible. También el control de la dirección y sentido de propagación del haz láser es más sencillo para realizar el barrido en la muestra [40-42].

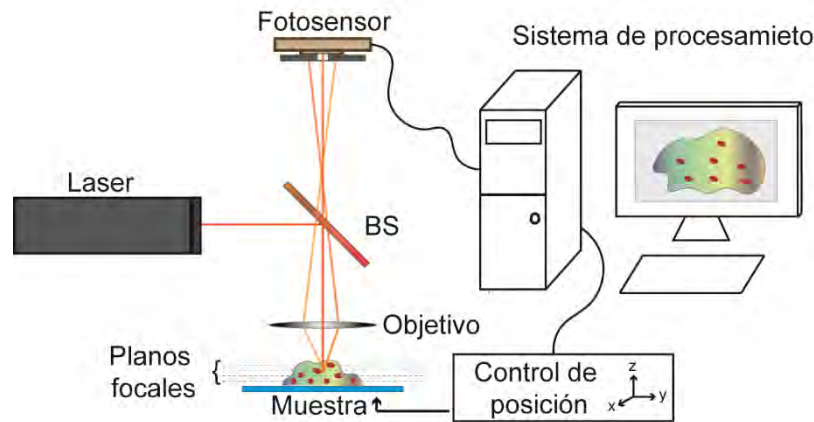


Figura 1.10 Sistema confocal con iluminación láser en donde se aprovechan las propiedades de coherencia, baja divergencia y monocromaticidad del láser para generar un haz de luz pequeño con mayor energía facilitando procesos como la autofluorescencia. BS: Separador óptico.

Uno de los objetivos que se propuso en nuestro trabajo fue el diseño de un sistema de barrido láser, por tal razón abordaremos de manera más extensa el tema en el Capítulo 2.

### 1.1.7 Defectos en las imágenes de los sistemas de microscopía

Los microscopios producen imágenes con defectos debido a las propiedades ópticas intrínsecas de sus componentes (lentes, espejos, separadores ópticos, etc.). Para que los sistemas ópticos cumplan la condición de un sistema óptico perfecto en cualquier par de planos ópticamente conjugados al eje de referencia es necesario que los rayos de luz estén dentro de la aproximación paraxial los cuales serán próximos al eje óptico. Los rayos que están dentro de la región paraxial se



denominan rayos paraxiales y los que no se definen como rayos marginales. Además, es necesario que los ángulos de incidencia y refracción sean lo bastante pequeños como para que su seno y su tangente se puedan aproximar al valor del ángulo y su coseno a la unidad. Estas condiciones ideales hacen que los rayos provenientes de un objeto o de una sub-imagen converjan en el plano de la imagen resultante, formándola sin aberraciones. Cuando los sistemas ópticos trabajan con aberturas grandes se rompe la aproximación paraxial y aparecen las aberraciones en las imágenes que empobrecen su calidad [43].

Las aberraciones se clasifican en 2 grupos:

Las aberraciones monocromáticas, donde se encuentra la esférica, el coma y el astigmatismo que producen imágenes difuminadas o confusas. También están las aberraciones de curvatura de campo de Pezval y la distorsión las cuales deforman las imágenes que producen los sistemas ópticos.

- La aberración esférica se produce cuando los rayos marginales paralelos al eje principal del sistema óptico inciden en él y al atravesarlo no convergen en el mismo punto del eje óptico que los rayos paraxiales.
- La aberración de coma se debe a que los rayos marginales oblicuos y que pasan a través de un sistema óptico no convergen en el mismo punto fuera del eje óptico.
- El astigmatismo se presenta cuando un objeto o fuente de luz pequeño que se encuentra alejado del eje óptico emite un cono de luz que al incidir en una lente lo hace de forma asimétrica, por lo que el cono emergente de luz tendrá los ejes principales asimétricos también.
- La curvatura de campo de Pezval se presenta por que los puntos de las superficies del objeto y la imagen no corresponderán uno a uno ya que los rayos no paraxiales no convergen en el plano de la imagen.
- La distorsión se presenta por la magnificación transversal de los sistemas ópticos que puede ser en función de la distancia de la imagen y como ya

hemos comentado en la región fuera de la zona paraxial esta distancia varia, modificando este este factor.

El segundo grupo corresponde a la aberración cromática que se presenta cuando una luz blanca atraviesa una lente y es dispersada en sus componentes de color, esto porque el índice de refracción varía en función de la longitud de onda formando imágenes con contornos de color (que no existen en el objeto real), véase la Figura 1.11.

Existen 2 tipos de aberración cromática:

La aberración cromática axial (ACA) que corresponde a la diferencia de foco para las distintas longitudes de onda ( $\lambda$ ), lo que provoca que haya una variación de la magnificación de la imagen en función de  $\lambda$ .

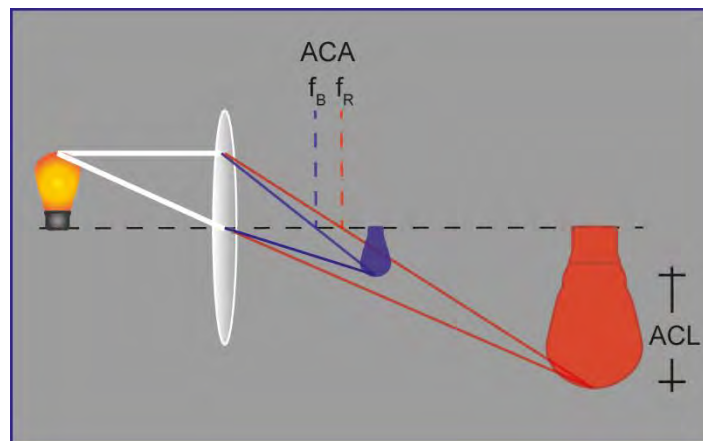


Figura 1.11. La aberración cromática se debe a que el índice de refracción de la lente es distinto para cada  $\lambda$ . Este tipo de aberración se manifiesta como la formación de distintos focos dependientes de  $\lambda$  (ACA); así como las distintas magnificaciones de las imágenes que depende de  $\lambda$  (ACL), formando bordes degradados de color en los objetos de las imágenes.

La aberración cromática lateral (ACL), definida como la consecuencia de los diferentes aumentos debidos a  $\lambda$  y se manifiesta como la formación de bordes degradados de color en los objetos de una imagen cuya fuente de iluminación es la luz blanca.

Las aberraciones en una imagen no se manifiestan de forma separada sino más bien en conjunto, lo que reduce de forma significativa la nitidez de las imágenes. El método más simple para reducir la presencia y/o magnitud de las aberraciones

empleando estrategias de óptica geométrica, es la reducción de las aperturas de los elementos ópticos con el fin de que el sistema opere solamente en la región paraxial.

Otro método es la combinación de lentes que compensen las aberraciones, como por ejemplo la corrección de aberración cromática, donde se usa una lente positiva hecha con un cristal de baja dispersión (cristal Crown) y una lente de más alta dispersión (cristal Flint). Esta configuración conocida como doblete acromático puede compensar la aberración cromática en la longitud de onda del color rojo y la del color azul.

El post-procesamiento de las imágenes para corregir las aberraciones después de capturarlas se presenta como otra alternativa, utilizando sistemas de formación de imágenes digitales y tratándolas con técnicas de procesamiento por computadora. Más adelante en el Capítulo 3 abordaremos de nuevo este tema con la descripción de un método digital de corrección de la aberración cromática lateral.

## **1.2 Procesamiento digital de imágenes**

Una imagen óptica es creada por los componentes ópticos del microscopio como una representación discreta de distribución de intensidades ( $I(x, y)$ ) en una superficie y que idealmente posee la información del objeto real bajo observación.

Una vez que la imagen óptica es detectada por una cámara digital esta es digitalizada mediante un proceso de muestreo y cuantificación convirtiéndola en una representación también discreta de valores de intensidad y posición ( $I_{(m,n)}$ ) formando a su vez una matriz numérica, véase la Figura 1.12.

La etapa inicial de digitalización de una imagen óptica es llevada a cabo por una cámara digital en la que la definición de la resolución digital y calidad de la imagen están determinadas por el sensor de imagen (CMOS o CCD) [44]. El sensor de imagen está constituido por un arreglo matricial de sensores fotónicos (fotositios) individuales los que definen la unidad mínima de una imagen digital o pixel (px).

Para formar la imagen digital se conjuga ópticamente el plano del campo visual de la muestra con la superficie del sensor ciñendo el tamaño de la imagen óptica al tamaño del sensor por lo que cada fotositio contendrá la información de la intensidad

de luz emitida por regiones pequeñas del campo visual de la muestra. Cuando la imagen óptica incide en el sensor los fotositios la convierten en señales eléctricas proporcionales a la intensidad de la luz que incide en ellos para que posteriormente el sistema de adquisición forme la imagen digital con esta información.

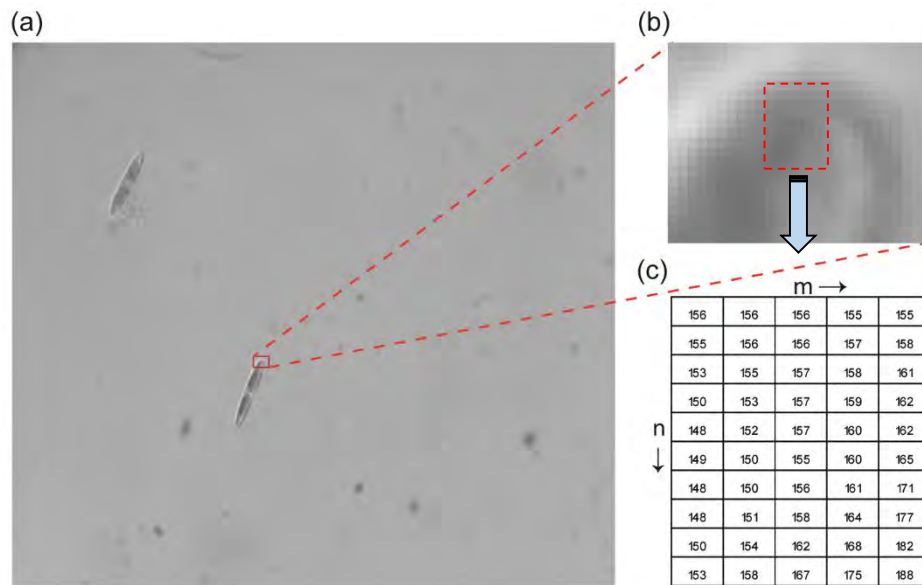


Figura 1.12 Ejemplo de una imagen digital. (a) La imagen corresponde a una diatomea de agua dulce en una escala de grises donde cada pixel puede tomar valores de intensidad desde 0 hasta 255 tonos de gris (a). Como se muestra en el cuadro emergente (b), una imagen es una representación discreta de intensidades y posiciones del objeto real en una matriz numérica, como se muestra en (c) y que corresponde al recuadro marcado en (b), a la cual se le pueden aplicar operaciones matemáticas para eliminar ruido o restaurar características deseables.

En principio las imágenes que proporciona el sensor CMOS son monocromáticas al solo detectar la cantidad de fotones que provienen de la muestra sin separar el contenido espectral; por lo tanto no es posible que puedan formar imágenes con color. Para resolver esta limitación se colocan arreglos de filtros ópticos de color sobre los fotositios (Figura 1.13), lo que proporciona información separada de los distintos colores primarios al arreglo matricial.

En el ojo humano la percepción de color es llevada a cabo por los conos, células fotosensibles que se encuentran ubicadas en la retina. Los colores para los cuales

los conos son más sensibles se conocen como colores primarios de la luz que han sido estandarizados por la Comisión Internationale de l'Éclairage (CIE) y corresponden al rojo (700 nm), verde (546 nm) y azul (435.8 nm). A partir de la mezcla de estos colores primarios es posible obtener todos los colores del espectro visible. Experimentalmente se ha observado que el ojo humano es más sensible al color verde (546 nm), por lo que percibe con más facilidad los cambios provocados por el verde en la mezcla de colores. El filtro de uso más común es el arreglo o mosaico de Bayer, el cual está formado por un 50% de filtros verdes (luminosidad), un 25% de rojos y un 25% de azules (color). La proporción que presentan el número de celdas verdes respecto a las rojas y azules genera una respuesta espectral que favorece la transmisión del color verde. La transmitancia óptica del filtro es del ~25% para el rojo, ~30% para el verde y ~35% [45, 46].

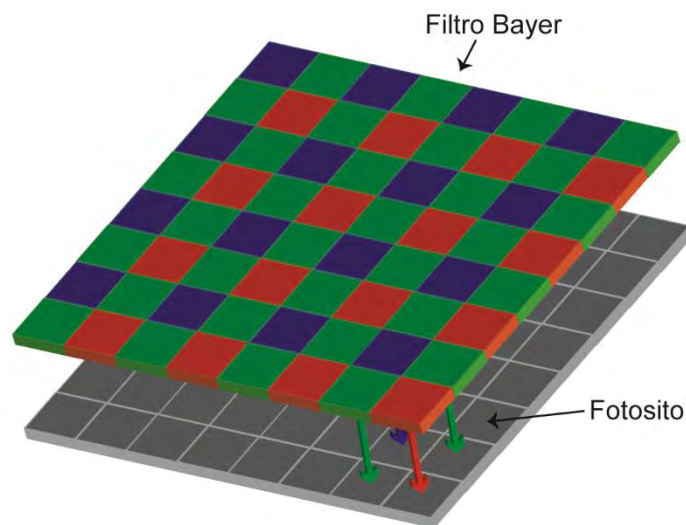


Figura 1.13 Filtro de color de Bayer el cual se coloca en la parte frontal del sensor de imagen y separa las componentes de color de la luz incidente en los fotositos. En este arreglo se duplica la información del color verde respecto al azul y rojo considerando que el ojo humano es más sensible a él.

### 1.2.1 Espacios de color

La ventaja del uso del color en imágenes para su procesamiento digital se debe a dos factores: a) el color es un descriptor que simplifica la identificación y extracción de los elementos de una imagen y b) la percepción visual del hombre distingue una

amplia gama de colores y en comparación a sólo dos docenas de niveles de gris lo cual facilita la distinción de características cuando se usa el color en las imágenes.

Los distintos colores que se crean con los colores primarios rojo (R), verde (G) y azul (B) definen un espacio de color que puede representarse mediante un modelo matemático con listas ordenadas de números. El objetivo de un modelo o espacio de color es facilitar la especificación de los colores de una forma normalizada y aceptada genéricamente. Un espacio de color se puede representar en un sistema de coordenadas tridimensional en el que cada color queda representado por un único punto. Entre los espacios de color utilizados más frecuentemente para el procesamiento de imágenes se encuentran el CIE 1931 XYZ, el sRGB y el L\*a\*b\*, los cuales se describen a continuación.

### ***El espacio de color CIE 1931***

El espacio de color CIE 1931 XYZ [47] fue establecido en 1931 por la CIE, en el cual definieron los tres colores primarios de la síntesis aditiva de color a partir de los cuales pueden crearse todos los demás. Por definición Y significa luminosidad, Z es estímulo de azul y X es una mezcla tendiente a la curva de sensibilidad del rojo al verde (Figura 14.a). Dado que la contribución de Z es en el azul, la cromaticidad de un color se estima principalmente con x e y, dos de los tres valores normalizados en función de X, Y y Z que se muestran en las siguientes ecuaciones.

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad (1.4)$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad (1.5)$$

$$z = \frac{Z}{X + Y + Z} \quad (1.6)$$

Donde z es el valor normalizado de Z.

### ***El espacio de color sRGB***

El modelo sRGB es formado por 3 matrices de color o canales de color y cada canal representa una componente espectral primaria: canal rojo, canal verde y canal

azul. Al mismo tiempo este espacio de color se puede representar en un sistema de coordenadas cartesianas donde  $R=X$ ,  $G=Y$  y  $B=Z$ , por lo que un punto está definido por la coordenadas  $(R, G, B)$ , véase la Figura 1.14b. La forma del este espacio de color es un tetraedro en el cual los valores sRGB están definidos en tres vértices:  $(1,0,0)$  para rojo,  $(0,1,0)$  para el verde y  $(0,0,1)$  para el azul. El cian se ubica en el vértice  $(0,1,1)$  el magenta en  $(1,0,1)$  y el amarillo en  $(1,1,0)$ . Finalmente el negro corresponde al origen  $(0,0,0)$  y el blanco se sitúa en el vértice más alejado del origen  $(1,1,1)$ . Por conveniencia el valor máximo de  $R$ ,  $G$  y  $B$  es 1. Las imágenes en este espacio de color se forman por la combinación en diferentes proporciones de cada uno de los colores primarios RGB [48].

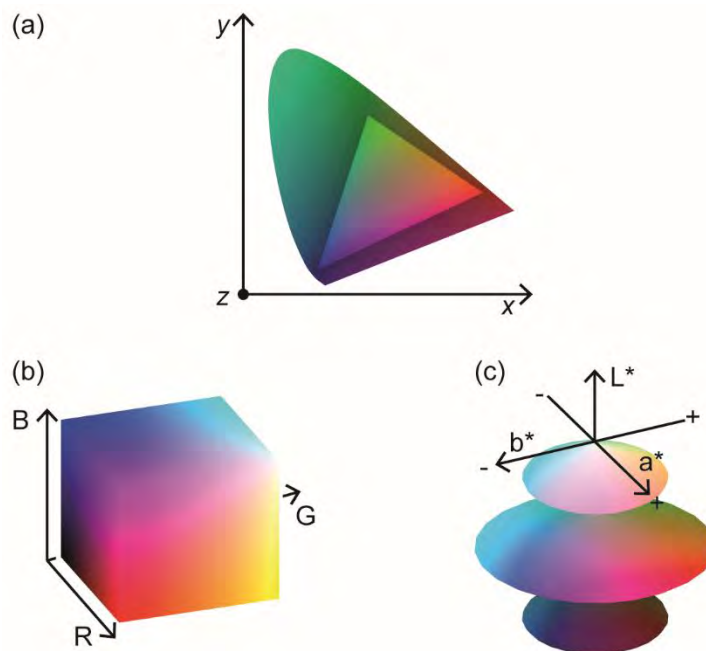


Figura 1.14 Espacios de color. En esta imagen se presenta los espacios de color utilizados en el área de procesamiento digital de imágenes: (a) El CIE 1931 XYZ, (b) el sRGB y (c) el  $L^*a^*b^*$ . Los 2 últimos espacios de color se derivan del CIE 1931.

La relación entre el espacio CIE 1931 y el espacio de color sRGB viene dado por las siguientes ecuaciones.

$$X = 0.4303R + 0.3416G + 0.1784B \quad (1.7)$$

$$Y = 0.2219R + 0.7068G + 0.0713B \quad (1.8)$$

$$Z = 0.0202R + 0.1296G + 0.0393B \quad (1.9)$$

La percepción visual de los estímulos de color se interpreta con los parámetros de tono, brillo y saturación. Los **tonos** son todos los colores primarios, secundarios e intermedios sin mezclar con blanco o negro. El **brillo** se entiende como la claridad u oscuridad de un tono. La **saturación** de un color se refiere a la pureza de un color un color saturado tiene un color vivo e intenso, mientras que un color menos saturado aparece más descolorido y gris. Cuando los valores de brillo cambian sin modificar el tono, perceptualmente pasamos de un tono al mismo tono con más brillo o menor brillo, este cambio se define como perceptualmente uniforme.

En la especificación de colores en términos de valores triestímulos y espacio cromático sRGB no es fácil de interpretar en términos de percepción del color es decir, brillo, tono y saturación, además los diagramas de cromaticidad asociados no son perceptualmente uniformes lo que dificulta el cálculo de las diferencias entre dos estímulos de color. En algunos casos, como por ejemplo la segmentación por color, es deseable contar con un espacio de color que se asemeje a la percepción visual del ojo como el espacio  $L^*a^*b^*$

### ***El espacio de color $L^*a^*b^*$***

El espacio de color Lab es la abreviatura del CIE 1976  $L^*a^*b^*$  (CIELAB) y el Hunter L, a, b. Ambos espacios son derivados del espacio CIE 1931 XYZ. El propósito de ambos es producir un espacio de color en el que un cambio de la misma cantidad en un valor de color produzca un cambio casi de la misma importancia visual (perceptivamente lineal). Lo anterior puede mejorar la reproducción de tonos cuando se almacenan colores en valores de precisión limitada, este espacio de color se muestra en la figura 1.14c.

El espacio CIELAB permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional, similar al del RGB. El eje  $L^*$  es el de saturación y va de 0 (negro) a 100 (blanco) o escala acromática de grises cuando  $a^*=b^*=0$  [49]. Los otros dos ejes de coordenadas son  $a^*$  (rojo –verde) y  $b^*$ (amarillo-azul) y sus valores van de -120 a 120.



Análogamente al espacio RGB, el espacio  $L^*a^*b^*$  está relacionado con el espacio de color CIE 1931 con las ecuaciones siguientes:

$$L^* = 116 * \left( \frac{Y}{Y_0} \right)^{\frac{1}{3}} - 15 \quad (1.10)$$

$$a^* = 500 * \left[ \left( \frac{X}{X_0} \right)^{\frac{1}{3}} - \left( \frac{Y}{Y_0} \right)^{\frac{1}{3}} \right] \quad (1.11)$$

$$b^* = 200 * \left[ \left( \frac{Y}{Y_0} \right)^{\frac{1}{3}} - \left( \frac{Z}{Z_0} \right)^{\frac{1}{3}} \right] \quad (1.12)$$

donde  $X_0$ ,  $Y_0$  y  $Z_0$  corresponde al tri-estímulo del estándar de iluminación D65 [50] utilizado para obtener X, Y y Z.

En la mayoría de los casos las cámaras digitales ocupan el espacio de color sRGB, tema que se describe en la siguiente sección.

### 1.2.2 Interpolación cromática

Una vez que el filtro de Bayer (Figura 1.15) ha separado las componentes de color en 3 matrices R, G y B, se presenta un efecto de omisión de pixeles derivado de este proceso el cual se ejemplifica en las Figuras 1.15b,c,d. Si este efecto no es corregido la imagen resultante es erosionada, véase la Figura 1.15h.

Para restaurar la imagen se aplican distintos procesos de interpolación entre pixeles vecinos con la finalidad de restaurar los pixeles omitidos (Figuras 1.15e, f, g) y por consecuencia se mejora la calidad de la imagen final, véase la Figura 1.15i. Este proceso de restauración se conoce como interpolación cromática o demosaicking [46].

### 1.2.3 Herramientas matemáticas utilizadas en el procesamiento digital de imágenes.

En el área del procesamiento digital de imágenes (PDI) se emplean técnicas y algoritmos matemáticos cuyo objetivo fundamental es obtener características

visuales de las imágenes de nuestro interés, tales como la reducción de ruido, la optimización del contraste y brillo, resaltar el color de bordes de objetos, etc. Dichas operaciones se pueden realizar tanto en el dominio espacial como en el de la frecuencia, se hace especial énfasis en el primero porque las técnicas empleadas en este trabajo corresponden a este dominio.

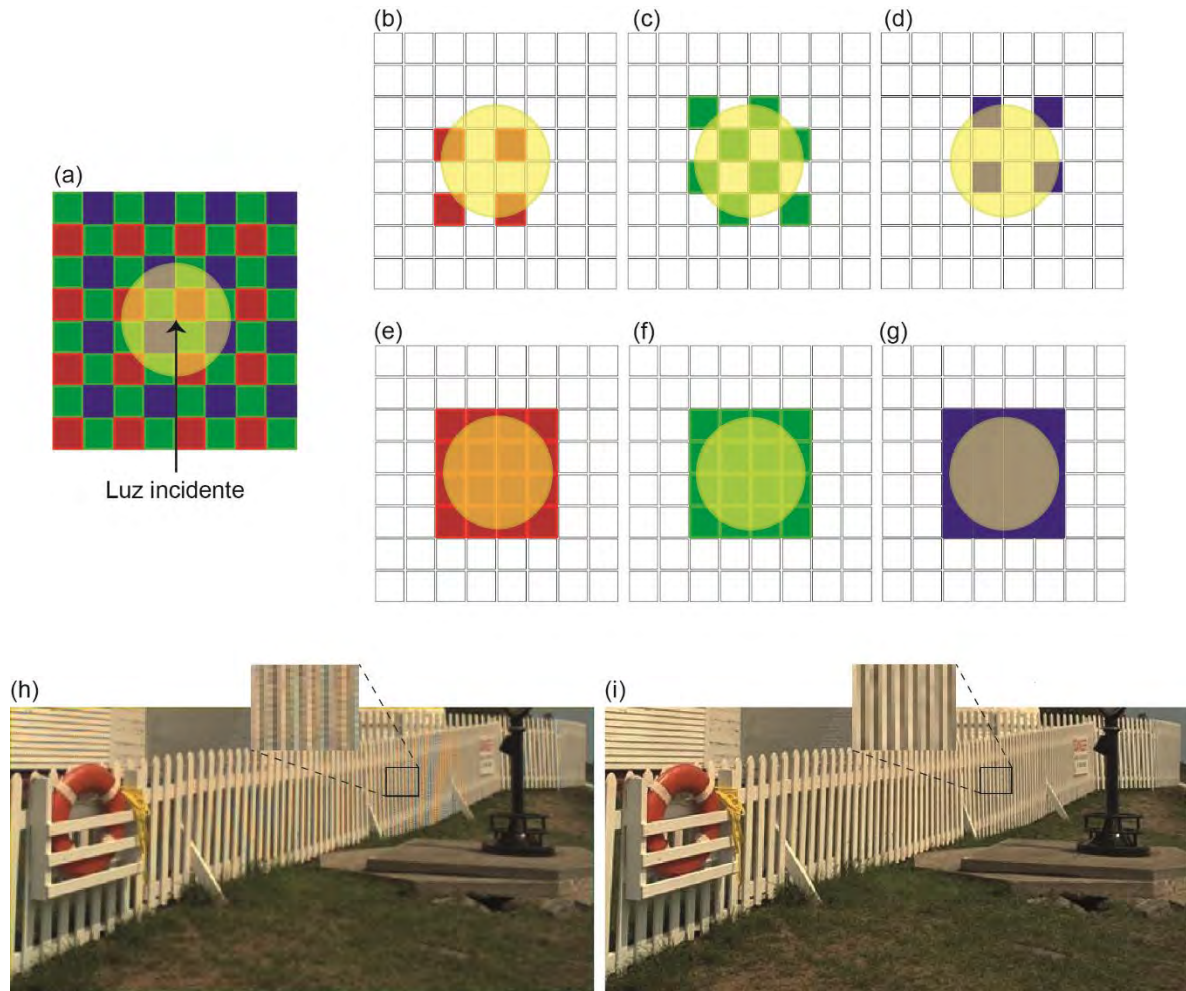


Figura 1.15 El proceso de interpolación cromática reduce los efectos negativos (h) de la ausencia de píxeles en el proceso de separación de componentes de color que sufre la luz que incide sobre el sensor de imagen y el filtro de Bayer (a, b, c, d). A cada matriz de color se le aplica un proceso de interpolación entre píxeles vecinos (e, f, g) para restaurar y mejorar la imagen (i).

En general el valor de una imagen digital en cualquier coordenada (m,n) es denotada por  $f(x,y)$  ( se hace la conversión de  $m=x$  y  $n=y$  para estandarizar la

nomenclatura utilizada en este texto con la literatura técnica existente). La sección del plano real abarcado por las coordenadas de una imagen se denomina como el dominio espacial, con  $x$  y  $y$  definidos como coordenadas espaciales.

Las operaciones que se realizan en el dominio espacial con las imágenes son del tipo arreglo, donde los procedimientos se realizan pixel por pixel. Por ejemplo, consideremos las siguientes imágenes de  $2 \times 2$ :

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{bmatrix} \text{ y } \begin{bmatrix} b_{11} & b_{12} \\ b_{21} & b_{22} \end{bmatrix}$$

El producto arreglo será

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_{11} & b_{12} \\ b_{21} & b_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11}b_{11} & a_{12}b_{12} \\ a_{21}b_{21} & a_{22}b_{22} \end{bmatrix}$$

Considerando lo anterior y que  $f(x,y)$  y  $g(x,y)$  son las matrices 2 imágenes, las cuatro operaciones aritméticas básicas son:

$$s(x,y) = f(x,y) + g(x,y) \quad (1.13)$$

$$r(x,y) = f(x,y) - g(x,y) \quad (1.14)$$

$$m(x,y) = f(x,y) \times g(x,y) \quad (1.15)$$

$$d(x,y) = f(x,y) \div g(x,y) \quad (1.16)$$

Las operaciones lógicas:

$$n(x,y) = \overline{f(x,y)} \quad (1.17)$$

$$a(x,y) = f(x,y) \bullet g(x,y) \quad (1.18)$$

$$o(x,y) = f(x,y) \vee g(x,y) \quad (1.19)$$

También es posible realizar operaciones de conjuntos, transformaciones geométricas espaciales, operaciones matriciales y utilizar métodos probabilísticos para procesar las imágenes [51].

Otro método para realizar operaciones sobre las imágenes esta denotada por la expresión

$$g(x,y) = T[f(x,y)] \quad (1.20)$$

donde  $f(x,y)$  es la imagen de entrada,  $g(x,y)$  ahora es la imagen procesada, y  $T$  es el operador definido sobre alguna vecindad de un punto en  $f(x,y)$ .

Para definir las operaciones en  $f(x, y)$  se define una sub-matriz centrada en  $(x,y)$  véase la Figura 1.16a. El centro de la matriz se mueve de punto a punto empezando en la esquina superior izquierda y finalizando en la esquina inferior derecha. Entonces cada punto definido de esta manera es vecino de un punto en  $f(x,y)$ .

Para obtener la nueva imagen el operador se aplica en cada punto de la sub-matriz de la imagen utilizando una para ello una máscara pequeña como por ejemplo una matriz 3 x 3 ( $m \times n$ ) cuyos valores de los elementos son escogidos para detectar una propiedad de la imagen (Figura 1.16b).

El centro de la máscara se mueve a lo largo de la imagen y en cada posición multiplicamos cada punto de la imagen que esta contenido dentro del área que ocupa la máscara por su correspondiente coeficiente. Entonces, el valor de cada punto de la nueva imagen  $g(x,y)$  se obtiene como

$$g(x,y) = \sum_{x=x-\text{floor}(h/2)}^{x+\text{floor}(h/2)} \sum_{y=x-\text{floor}(h/2)}^{y+\text{floor}(h/2)} f(x,y)w(x,y) \quad (1.21)$$

donde  $h$  es el tamaño de la matriz y  $w(x,y)$  es la matriz del operador.

Con este método es posible aplicar distintos tipos de procesos en las imágenes como el filtrado [52], reconstrucción [53] y segmentación. Por lo general los pixeles que se encuentran en las fronteras de la imagen no se modifican, bajo el criterio de que estos no representan información relevante de la imagen.

(a)			(b)		
$f(x-1,y-1)$	$f(x,y-1)$	$f(x+1,y-1)$	$w(x-1,y-1)$	$w(x,y-1)$	$w(x+1,y-1)$
$f(x-1,y)$	$f(x,y)$	$f(x+1,y)$	$w(x-1,y)$	$w(x,y)$	$w(x+1,y)$
$f(x-1,y+1)$	$f(x,y+1)$	$f(x+1,y+1)$	$w(x-1,y+1)$	$w(x,y+1)$	$w(x+1,y+1)$

Figura 1.16 La vecindad entre las posiciones de una imagen en este ejemplo  $f(x,y)$  corresponde a una porción de la imagen y  $w(x,y)$  a una máscara de operador.

Dentro de los operadores más utilizados en el procesamiento de imágenes se encuentra la convolución que es un operador matemático que transforma dos funciones  $f(x,y)$  y  $g(x,y)$  en una tercera función que representa la magnitud en la que se superponen  $f(x,y)$  y una versión trasladada e invertida de  $g(x,y)$ . La expresión matemática que representa a la convolución es la siguiente.

$$f(x,y) * g(x,y) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} f(m,n)g(x-m,y-n) \quad (1.22)$$

Las operaciones fundamentales que se han mostrado en este apartado sirven de base para el desarrollo de métodos de procesamiento más complejos como la agrupación o clustering de objetos, tema del cual hablaremos a continuación.

#### 1.2.4 Técnica de agrupación K-means

El proceso de segmentación en el área de PDI consiste en separar el contenido de una imagen en varios grupos para su posterior análisis y clasificación, cada cual definido por características como morfología, color o píxeles vecinos. En este tipo de procesos se utilizan como herramientas los algoritmos de agrupamiento (clustering) que son procedimientos de agrupación de una serie de datos o arreglos acorde a una característica común. Estas características o criterios de agrupamiento son por lo regular distancias o similitudes. El conocimiento de los grupos puede permitir una representación de un conjunto de datos complejo en un conjunto sintetizado. Esta descripción sintética se consigue sustituyendo la descripción de todos los elementos de un grupo por la de un representante característico del mismo.

Existen 2 técnicas principales para generar agrupaciones:

- Clúster jerárquico, que puede agrupar o dividir el conjunto de datos de forma ascendente o descendente.
- Clúster no jerárquico, en los que el número de grupos se determina de antemano y los vectores se van asignando a los grupos en función de su cercanía como es el caso del algoritmo K-means.

El algoritmo K-means, creado por MacQueen [54] en 1967 es el algoritmo de clustering más conocido y utilizado debido a su simplicidad. Sigue un procedimiento

de clasificación de un conjunto de objetos en un determinado número  $K$  de clústeres, con  $K$  determinado a priori. El nombre de K-means viene porque representa cada uno de los clústeres por la media (o media ponderada) de sus puntos, es decir por su centroide. La representación mediante centroides tiene la ventaja de que tiene un significado gráfico y estadístico inmediato. Cada clúster por tanto es caracterizado por su centro o centroide que se encuentra entre los elementos que componen el clúster.

Los pasos principales del algoritmo K-means estándar se presentan a continuación:

- 1) Inicialización: Consiste en definir los objetos que se van a particionar, el número de grupos y el centroide para cada grupo. Se han propuesto varios métodos para definir los centroides iniciales aunque el enfoque más utilizado sigue siendo la selección aleatoria [55].
- 2) Clasificación: Para cada objeto se calcula su distancia hacia todos los centroides, se identifica el centroide más cercano y se asigna el objeto al grupo asociado con dicho centroide.
- 3) Cálculo de centroides: En este paso se recalcula el centroide para cada grupo generado en el paso anterior.
- 4) Criterio de convergencia: Consiste en establecer el criterio de paro del algoritmo, por ejemplo cuando se alcanza un número determinado de iteraciones, cuando no hay intercambio de objetos entre los grupos o cuando la diferencia de los centroides en dos iteraciones consecutivas es menor a un umbral dado. Si no se satisface la condición de convergencia se repiten los pasos 2, 3 y 4.

Uno de los inconvenientes principales del K-means, además del hecho de que sea necesario realizar en sucesivas ocasiones el algoritmo para así obtener un resultado óptimo, es la necesidad de inicializar el número de prototipos al principio de la ejecución. Esto perjudica la eficacia del algoritmo ya que en la práctica no se conoce a priori el número de clústeres finales.

Los conceptos que se han revisado previamente en este capítulo resaltan la importancia de la microscopía y sus distintas técnicas de iluminación como herramienta de análisis, pero existe un particular interés en la nitidez en las imágenes que se producen en estos equipos. Una imagen de baja calidad proporciona datos o información con la misma característica que en muchos de los casos son de poca utilidad o fiables. Como herramientas complementarias las técnicas de PDI pueden incrementar la nitidez de las imágenes y por consecuencia la fiabilidad de los datos que se obtienen de las imágenes, así como también resaltar aún más características de interés como bordes, colores, agrupación de elementos, etc. Estas consideraciones sustentaron la realización de nuestras propuestas, las cuales describiremos en los siguientes capítulos.

# Capítulo 2

## Construcción de un sistema de barrido láser

Un sistema de barrido láser tiene como función principal controlar la dirección de un haz laser utilizando espejos móviles [56], moduladores opto-acústicos [57], óptica adaptiva [58], entre otros componentes. El uso y aplicación del sistema de barrido láser abarca temas como la medición de morfología facial [59], lectores de código de barras [60], fotogrametría [61], microscopía confocal [62], etc. Nuestro interés en el desarrollo del sistema de barrido radica en la posibilidad de utilizarlo en un sistema portable de microscopía confocal.

En el campo de la microscopía óptica, el desarrollo de dispositivos portátiles se presenta como una solución adecuada para el análisis de los especímenes *in situ*. Con esto se busca mantener las condiciones naturales de la muestra y reducir las alteraciones intrínsecas asociadas al proceso de preparación de una muestra para su observación en un microscopio óptico de escritorio [63, 64].

Con el fin de trasladar las capacidades de un microscopio confocal a un espacio más pequeño se han utilizado dispositivos como la fibra óptica [65], objetivos tipo miniatura [66], lentes miniatura [64], etc. Lo anterior ha implicado retos como lograr que un haz láser se enfoque en la muestra realizando un barrido de alta velocidad (con anchos de banda del orden de kHz) sobre ella y en áreas confinadas (del orden de milímetros) evitando la deriva mecánica [67]. En el campo de la microscopía la deriva mecánica o deriva de enfoque es una variable que describe la incapacidad del instrumento para mantener fijo el plano de enfoque por un periodo extendido de tiempo. El factor principal que influye en la deriva a mecánica es la variación de la temperatura en las partes mecánicas del instrumento, en los portaobjetos, en el medio de preparación de la muestras e incluso en las muestras.



Con el desarrollo de tecnologías emergentes como los sistemas microelectromecánicos (MEMS por sus siglas en inglés) se ha logrado miniaturizar elementos ópticos como espejos, filtros ópticos y lentes, compactando los sistemas de barrido laser y como consecuencia la estructura de los sistemas portables de microscopía confocal [16, 63, 64]. Con estas adecuaciones se ha logrado el barrido de campos visuales de  $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$  [68] y la captura de imágenes en tiempo real de hasta 8 cuadros por segundo [66].

En este capítulo se describen el diseño, la construcción y la caracterización de un sistema de barrido laser que tiene como objetivo principal su aplicación en un sistema de microscopía confocal portátil. Partiendo de un diseño genérico ya existente de un circuito de control Proporcional-Integral Derivativo, en este trabajo de tesis se modificó dicho circuito, se elaboraron los circuitos electrónicos correspondientes y se integró un sistema de retroalimentación en donde el elemento clave de estabilización fue un sensor de posición de cuatro cuadrantes (*Position sensitive diodes* o PSD). Utilizando este sistema diseñado y construido por nosotros logramos mejorar significativamente la precisión del barrido de nuestro sistema.

## **2.1 Microscopio de campo claro invertido**

Utilizamos un microscopio de campo claro como estructura de soporte para implementar la técnica confocal y cuyo esquema óptico se muestra en la Figura 2.1, donde se utiliza un objetivo 100x (OBJ) de inmersión en aceite con una apertura numérica de  $NA= 1.3$  y un sistema óptico con corrección al infinito. Debido a que el haz de salida del objetivo idealmente puede propagarse indefinidamente hasta que se coloque una lente convergente en el camino óptico, el sistema permite que el espacio de la estructura óptica se pueda ajustar acorde a las necesidades del diseño, facilitando la ubicación de más componentes ópticos. Otra ventaja importante de esta configuración es que el haz colimado es menos susceptible a las aberraciones introducidas por los elementos ópticos adicionales [26].

El objetivo se colocó en una posición vertical con la apertura frontal hacia arriba (posición que corresponde a la estructura de un microscopio invertido), lo cual hace

que la luz que proviene de una muestra iluminada tenga un sentido de propagación vertical hacia abajo. El espejo M1 cambia la dirección en 90° modificando la trayectoria a una propagación horizontal. El espejo dicroico (DICR1) refleja la luz proveniente de M1 en 90° de nuevo (manteniendo su trayectoria paralelo al plano horizontal) para hacerla incidir en la lente convexa L1 ( $f_{L1}=100$  mm), conjugando ópticamente el plano de la muestra con el plano del sensor de la cámara CMOS1. Además, DICR1 separa las distintas fuentes de iluminación y que corresponden a las longitudes de onda de 632.8 nm (rojo) del láser He-Ne utilizado en el sistema de barrido y 430 nm (azul) del sistema de iluminación LED (I1).

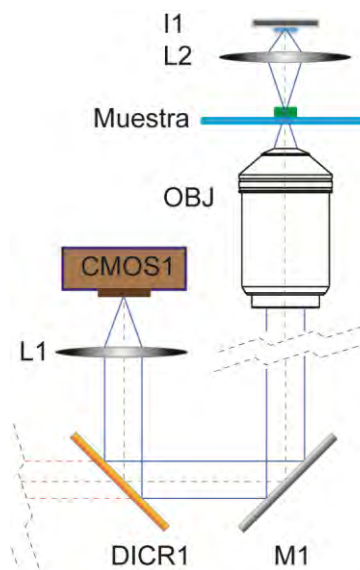


Figura 2.1 Sistema mínimo del microscopio de campo claro invertido. El arreglo óptico entre L1 y el objetivo corregido al infinito facilita la manipulación del espacio entre ellos permitiendo colocar los elementos ópticos acorde a las necesidades del diseño. L1: lente  $f=100$  mm, DICR1: espejo dicroico, M1: espejo, OBJ: objetivo 100X. I1: Led de 3 W de potencia, color azul, L2: lente  $f=30$  mm.

### 2.1.1 Sistema de iluminación

Las fluctuaciones de la intensidad en la iluminación tienen efectos principalmente de inestabilidad lumínica temporal que se manifiesta como la variación de la intensidad promedio de las imágenes cuando se captura la misma escena de forma secuencial. Por ejemplo, en la conversión de una imagen en escala de grises a una imagen binaria se usa un valor de umbral de intensidad (*threshold*) como factor de conversión el cual se obtiene de las cuentas de las intensidades de los pixeles de

la imagen. Como cada imagen (en nuestro ejemplo) tiene distinta ponderación en intensidad, la transformación puede generar resultados diferentes aunque se trate de la misma escena [69, 70].

El sistema de iluminación de nuestra propuesta está conformado por I1 y L2 en una configuración de iluminación crítica. Utilizamos un dispositivo LED de 3 W de potencia como fuente de luz, considerando que sus características ópticas y eléctricas incrementan el desempeño de la iluminación [71, 72]. La intensidad lumínica de un LED es proporcional a su corriente por ello es necesario que esta variable sea constante [73], para lograrlo implementamos un sistema electrónico retroalimentado Proporcional-Integral Derivativo (PID), el circuito que implementamos es una variación del sistema utilizado en la referencia [74]. Un sistema de control retroalimentado es un conjunto de elementos que proporciona una señal de salida en respuesta a una señal de entrada o valor deseado (Set-point o SP). Cuenta con un elemento de supervisión en la salida (retroalimentación) el cual se utiliza para comparar el valor deseado con el valor obtenido (señal de error). Al evaluar la señal de error el sistema buscará siempre llegar al valor de referencia forzando a que la señal de error tienda a ser cero, lo cual se logra igualando el valor la señal de salida a el valor la señal de entrada [74-76].

En la Figura 2.1 se muestra el diagrama electrónico del sistema de control de la corriente del LED. El Bloque I determina el voltaje de referencia ( $V_{SP}$ ) del PID ya sea de forma manual con POT2 o con una señal externa en  $V_{IN}$ , el ajuste fino para la opción manual se realiza con POT1. El Bloque II desactiva la señal  $V_{SP}$  con una señal digital externa  $DIG_{ON-OFF}$  cuando la función del sistema lo requiera. Esta opción es útil en casos donde el encendido y apagado de la carga requiere una respuesta transitoria rápida y con el menor ruido eléctrico posible. El Bloque III es el control PID de un solo elemento activo [76], en el que se adicionaron 2 dispositivos de conversión de voltaje-corriente (BUF1 y BUF2) para alimentar la carga de salida. La señal de retroalimentación es proporcionada por el convertidor de corriente-voltaje formado por IC2 y el sensor de corriente SENS [74].

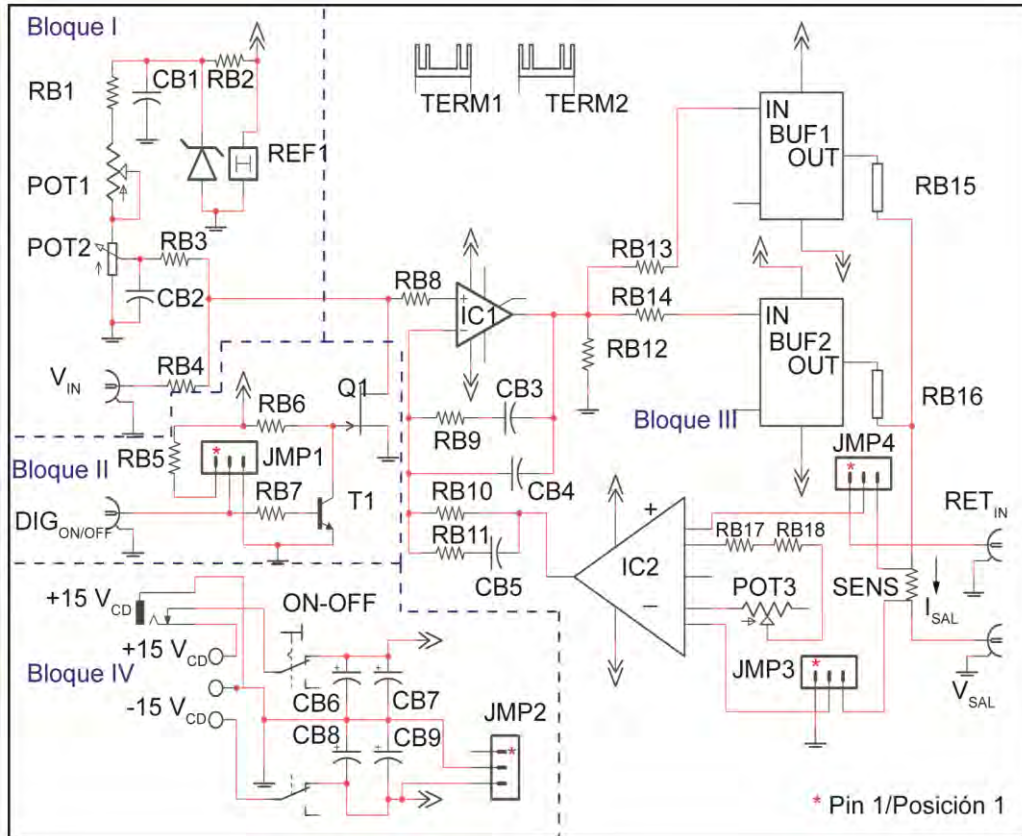


Figura 2.2 Diagrama esquemático del control electrónico de corriente. El Bloque I corresponde al control manual de la corriente o por medio de un voltaje en  $V_{in}$ . El bloque II controla el encendido y apagado del sistema con una señal digital. El bloque III es el control PID de corriente. El bloque IV es la conexión de alimentación del sistema electrónico.

En este sistema PID es posible cambiar el sensor que se utiliza como señal de retroalimentación (SENS) por una señal externa usando JMP3 y JMP4. El Bloque IV es la etapa de conexión de alimentación externa para el sistema electrónico con la opción de seleccionar si la fuente de alimentación es dual o solamente positiva con JMP2.

La caracterización del PID se realizó aplicando 2 señales típicas en los sistemas de control [77]: a) una rampa de voltaje definida en un rango de  $V_{in}=1.9 V_{CD}-5 V_{CD}$  y (b) una señal escalón unitario definida por  $V_{in}=4u(t)$  para  $t_1=50$  ms y  $V_{in}=0$  para  $t_2=50$  ms con una frecuencia de 10 kHz. En ambos casos la carga fue un LED de potencia con un voltaje de polarización de  $V_F=2V$  y corriente de polarización de  $I_F=300$  mA.  $u(t)=1V$  para  $t \geq 0$ . La señal de entrada en este análisis está relacionada

con el voltaje de control  $V_{IN}$ . La señal salida es el voltaje medido en SENS ( $V_{SENS}$ ) el cual está relacionado con la corriente de salida con  $V_{SENS}=R \cdot I_{SAL}=1 \text{ ohm} \cdot I_{SAL}$ .

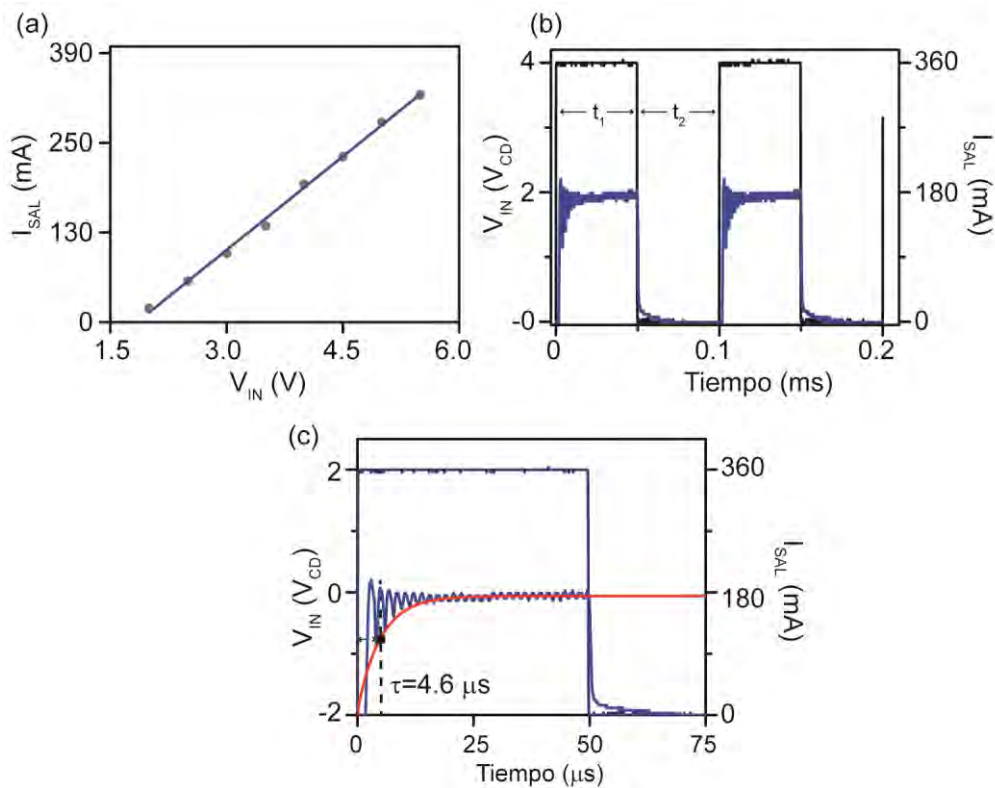


Figura 2.3 Caracterización del sistema PID. (a) La corriente de salida ( $I_{SAL}$ ) del PID en función del voltaje de entrada ( $V_{IN}$ ) representado por los puntos negros tienen una tendencia lineal como lo muestra la curva de ajuste (línea azul). El factor de conversión entre las 2 variables está dado por la pendiente de la recta de ajuste  $k = I_{SAL} / V_{IN} = .09A / V$  y (b-c) la constante del tiempo del PID fue de  $4.6 \mu s$ .

En la Figura 2.3a se muestra la relación de la corriente de salida en función del voltaje de entrada (puntos negros) y su ajuste a una función lineal (línea azul) donde se observa que la tendencia es prácticamente lineal y el factor de conversión entre el voltaje y la corriente (pendiente de la recta) está dado por  $I_{SAL} / V_{IN} = .09A / V$ . El tiempo de respuesta del sistema se calculó a partir del análisis de la respuesta del sistema a una señal cuadrada (Figuras 2.3b, c). Se consideró a la transición de subida del voltaje de entrada como la referencia para determinar el tiempo de respuesta y se estimó como el tiempo necesario para que la señal de salida alcanzara el 63.2% de su valor máximo [78], que en este caso fue de  $\tau = 4.6 \mu s$ .

## **2.2 Caracterización del láser He-Ne**

Existen variables de control en la topología propuesta del sistema de barrido que dependen de la intensidad del haz laser, como por ejemplo las que proporciona el sensor de posición en donde las señales de salida proveen la posición del haz en su superficie y están sujetas también al valor de la intensidad de haz incidente. Si la intensidad tiene variaciones significativas entonces la información de la posición variará, aun cuando el haz incidente no modifique su ubicación; reduciendo la confiabilidad en la información de la posición del haz.

Las fluctuaciones de la amplitud y la frecuencia de los láseres de gas He-Ne son consecuencia de las variaciones en la longitud de la cavidad resonante del láser debido a la expansión térmica del tubo de vidrio. La expansión y contracción térmica causan que la frecuencia de resonancia de la cavidad se desplace a través de la curva de ganancia del láser y a su vez produzca cambios de intensidad y frecuencia en su salida. Además, el haz laser es afectado por otras fuentes de ruido como las variaciones de voltaje o corriente en su fuente de alimentación, deterioro de su sistema de bombeo, reflexiones de retorno del sistema óptico, vibraciones mecánicas, entre otros [79]. Estos factores también pueden cambiar el estado polarización (EP) del láser. A partir de estas consideraciones el primer paso para realizar el diseño de nuestro sistema de barrido fue caracterizar la intensidad del láser.

### **2.2.1 Estabilidad de la intensidad del láser**

El sistema experimental con el cual se determinó la estabilidad de la intensidad del láser se muestra en la Figura 2.4a. En este arreglo el haz incide en el sensor después de propagarse a través de la lámina de media onda ( $\lambda/2$ ) y el separador óptico polarizado (Polarized beam splitter o PBS). La lente L asegura que el haz incida completamente en la superficie del sensor. El voltaje de salida del sensor DET es proporcional a la intensidad lumínica y se registró con una tarjeta de adquisición de datos PCI 6221 de National Instruments durante un tiempo mayor a 2 horas.

En la Figura 2.4b se observa un esquema de los EP de los componentes de nuestro sistema experimental; donde  $EP_{R(\theta)}$  es la matriz de rotación que describe la rotación que puede sufrir EP lineal del láser respecto al eje X como consecuencia de condiciones descritas en el párrafo anterior,  $EP_{\lambda/2}$  corresponde a la lámina de retardo y  $EP_{PBS}$  al separador óptico. El eje rápido de  $EP_{\lambda/2}$  y el eje de transmisión de  $EP_{PBS}$  son paralelos al eje X. Consideramos que la lente L no cambia el EP del láser.

Supongamos entonces que se hace incidir el haz con EP lineal con un ángulo de  $45^\circ$  respecto al eje X, y queremos conocer su EP después de propagarse a través del arreglo experimental. Consideremos también las matrices de Jones que representan los estados de polarización de los componentes y que están definidos por las ecuaciones:

$$M_{E_1(t)} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} \quad (2.1)$$

$$M_{R(\theta)} = \begin{bmatrix} \cos \theta & \text{sen} \theta \\ -\text{sen} \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

$$M_{\lambda/2} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & e^{-j\Gamma} \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

$$M_{PBS} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

donde  $M_{E_1(t)}$  es la matriz del EP lineal del haz con un ángulo de  $45^\circ$  respecto al eje X,  $M_{R(\theta)}$  es la matriz de rotación del haz,  $M_{\lambda/2}$  es la matriz del EP de la lámina de media onda con el eje rápido vertical y  $M_{PBS}$  es la matriz del separador óptico polarizado con el eje transmisión vertical.  $\Gamma$  es el ángulo de fase de la lámina de retardo. Utilizando el criterio de Jones, el estado de polarización de láser después propagarse por el sistema óptico de prueba es

$$E_2(t) = M_{PBS} M_{\lambda/2} M_{R(\theta)} E_1(t) \quad (2.5)$$

sustituyendo las ecuaciones 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4 en 2.5 se tiene que

$$E_2(t) = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & e^{-j\Gamma} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\theta & \text{sen}\theta \\ -\text{sen}\theta & \cos\theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} E_1(t) \quad (2.6)$$

resolviendo

$$E_2(t) = [\cos\theta \quad \text{sen}\theta] \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} E_1(t) \quad (2.7),$$

la ecuación 2.7 muestra que el valor del campo eléctrico resultante ( $E_2(t)$ ) depende del ángulo de incidencia de EP lineal y por consecuencia la intensidad lumínica cambiará también respecto a esta variable.

En este punto es importante comentar que este arreglo responde también a las variaciones de la intensidad que no surgen del estado de polarización del haz, por lo que la intensidad del haz en la salida del arreglo es la ponderación de distintas fuentes sin que se logre conocer la contribución de cada una.

En la Figura 2.4c se muestra la gráfica que representa los resultados de la prueba del voltaje de salida del sensor en función del tiempo. El voltaje promedio fue de 2.4  $V_{CD}$  con una desviación estándar de 0.0115 $V_{CD}$ , el porcentaje de variación durante el tiempo de la prueba fue menor al 1% considerándolo como un valor aceptable para nuestra aplicación.

Otro parámetro importante en la caracterización del láser es el diámetro principal el cual tiende a cambiar conforme se propaga en un medio, además define algunas características operativas del sistema del que forma parte como lo es la resolución óptica del sistema confocal. En la siguiente sección se describe este tópico.



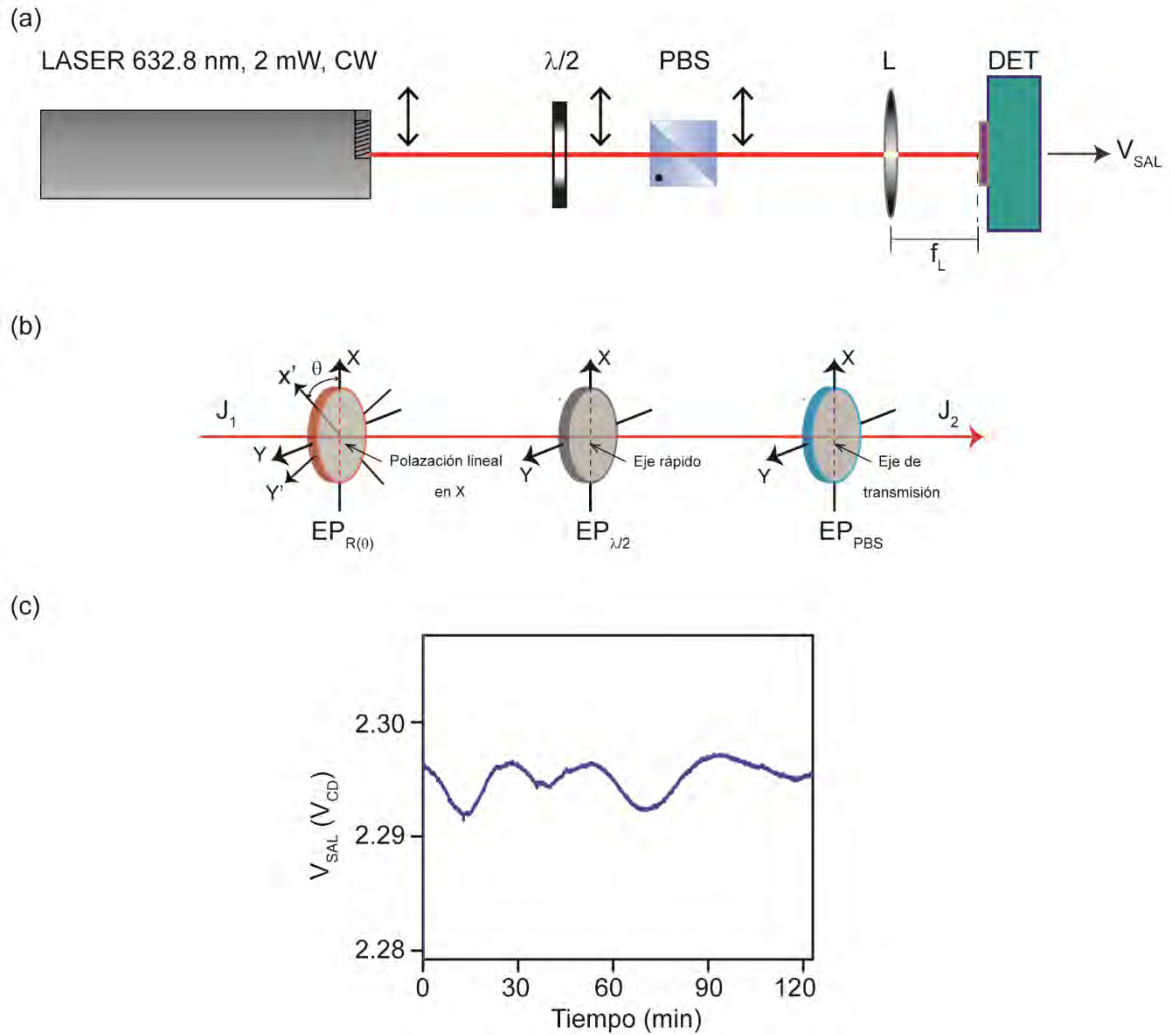


Figura 2.4 Caracterización de la estabilidad de la intensidad del láser. (a) Sistema experimental utilizado en la caracterización de la estabilidad de la intensidad. En (b) se muestra la aproximación de los estados de polarización del haz de cada uno de los elementos del sistema óptico de prueba (véase texto). (c) El porcentaje global de la variación de la intensidad fue menor al 1% durante un tiempo mayor a 2 h.  $\lambda/2$ = lámina de retardo de media onda, BSP: separador óptico polarizado, L=lente convexa  $f=50$ mm, DET: sensor de luz, las líneas con 2 flechas indican un EP lineal vertical.

### 2.2.2 La cintura ( $w_0$ ) del láser

Cuando un láser se propaga a través de un medio como el aire diverge transversalmente al sentido de su propagación modificando su diámetro principal ( $2w_0$ ) a lo largo de su trayectoria [80-83].

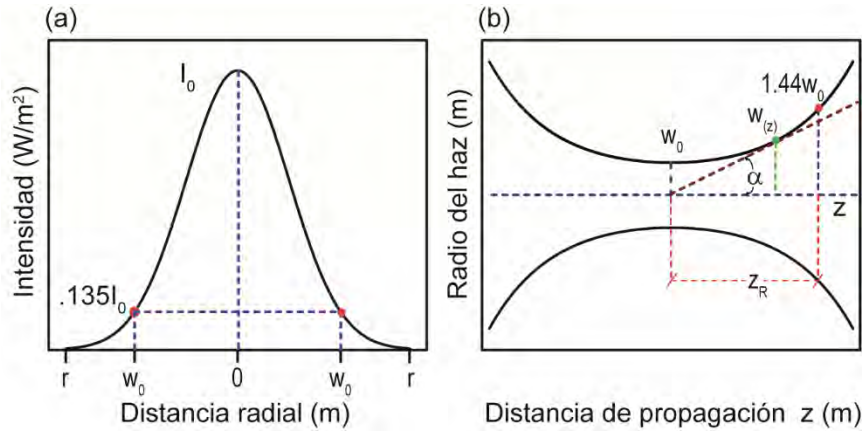


Figura 2.5 Perfil gaussiano de un haz láser. (a) La cintura del haz  $w_0$  es el punto a lo largo de la dirección de propagación del haz donde el radio del láser tiene un mínimo. (b)  $w(z)$  es el radio del haz después de propagarse una distancia  $z$ , considerando su origen  $z_0$  en la posición de  $w_0$ .  $Z_R$  es la profundidad de enfoque del haz o la distancia de Raleigh a partir de  $z_0$ .

Para un perfil del haz láser con una distribución Gaussiana como el usado en este trabajo (Figura 2.a), la divergencia del haz está definida por las siguientes ecuaciones.

$$w(z) = \left[ 1 + \left( \frac{\lambda z}{\pi W_0^2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.8)$$

$$R(z) = \left[ 1 + \left( \frac{\pi W_0^2}{\lambda z} \right)^2 \right] \quad (2.9)$$

$$Z_R = \frac{\pi W_0^2}{\lambda} \quad (2.10)$$

$$\alpha \approx \frac{\lambda}{\pi W_0} \quad (2.11)$$

Donde  $z$  es la distancia de propagación del haz a partir de la zona donde  $w_z$  es mínimo ( $z_0=0$ ),  $\lambda$  es la longitud de onda del haz, el parámetro  $w(z)$  es el radio del haz después de propagarse una distancia  $z$ ,  $R(z)$  es el radio de curvatura de la divergencia del haz después de propagarse una distancia  $z$ ,  $Z_R$  es la longitud de

Raleigh, y  $\alpha$  se conoce como la divergencia del haz. Todos estos parámetros están representados en la Figura 2.5b.

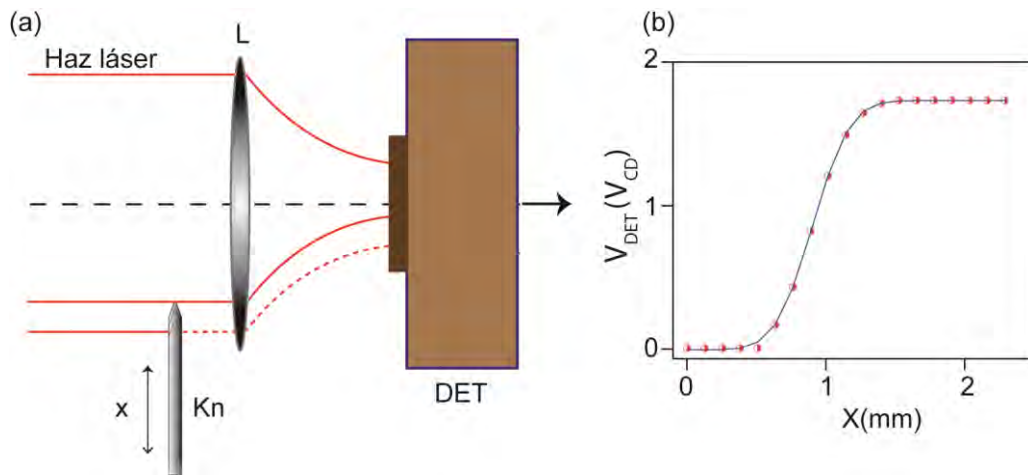


Figura 2.6 Cálculo de  $w_0$  con la técnica del filo de la navaja. (a) En esta técnica se utiliza una navaja para cortar el haz registrando los cambios de la intensidad con DET y el desplazamiento de la posición de la navaja. (b) El ajuste de los datos a una función de error nos proporcionó el valor de  $w_0 = 0.42$  mm. L: lente  $f_L = 50$  mm, Kn: navaja, DET: sensor de luz.

Caracterizamos el parámetro  $w_0$  con la técnica de “filo de la navaja” [84-86], en la cual colocamos una navaja (Kn) en una plataforma móvil graduada para realizar un movimiento lineal controlando la posición del filo de Kn, desplazándolo en el sentido del movimiento de la plataforma y en una posición perpendicular al sentido de propagación del láser, la distancia entre la navaja y la apertura de salida del tubo del láser fue de 10 cm. Kn se desplazó en pasos de 250  $\mu\text{m}$  cortando el perfil Gaussiano del láser como se bosqueja en la Figura 2.6a. El haz resultante fue evaluado con un sensor óptico DET110 (DET) y un multímetro BK TOOL KIT 2706-A, registrando simultáneamente la posición en cada paso.

Los datos de la intensidad (voltaje) se graficaron en función de la posición de la navaja (Figura 2.6b) para su posterior ajuste a una función de error. El valor que se obtuvo de la cintura fue de  $w_0 = 0.42$  mm.

### 2.2.3 Magnificación de la cintura $w_0$ del láser

En un sistema confocal, el objetivo realiza la función de iluminar la muestra y al mismo tiempo recolectar la luz reemitida por ella. Al incidir el haz láser en el objetivo por la apertura trasera e iluminar la muestra con la apertura frontal, la cintura del

haz se reduce en tamaño y se considera una aproximación a la resolución del sistema confocal de acuerdo a las siguientes ecuaciones.

$$res_{xy} = \frac{0.6\lambda}{NA} \quad (2.12)$$

y

$$res_{axial} = \frac{1.4\lambda}{NA^2} \quad (2.13)$$

Donde  $res_{xy}$  y  $res_{axial}$  representan la resolución lateral y axial respectivamente del sistema confocal. NA es la apertura numérica el objetivo y  $\lambda$  la longitud de onda de la fuente de iluminación.

Para que se cumplan las condiciones de máxima resolución definidas por las ecuaciones 2.12 y 2.13 es necesario que el láser llene completamente la apertura trasera del objetivo (6 mm en nuestro sistema). En consideración a lo anterior, implementamos un arreglo óptico del telescopio de Kepler como el que se muestra en la Figura 2.7, para aumentar el diámetro de la cintura del láser y acoplarla a la apertura trasera en el objetivo. El factor de magnificación del arreglo es

$$M = \frac{f_2}{f_1} \quad (2.14)$$

donde M es la magnificación del arreglo óptico,  $f_1$  la distancia focal de la lente L1 y  $f_2$  es la distancia focal de la lente L2.

Si consideramos el parámetro  $w_0'$ , como referencia para llenar la apertura trasera del objetivo la potencia del láser incidente sobre la muestra será solamente del 86.5%. Por otro lado si consideramos el radio máximo (100% de la potencia) del perfil del láser acoplado a la apertura del objetivo, el sistema será susceptible a tener variaciones del diámetro del haz resultante debido a que las vibraciones e inestabilidad mecánica pueden desalinearse el sistema óptico y como consecuencia desviar el haz enfocado en la apertura trasera del objetivo. Definimos entonces un criterio arbitrario de utilizar el 95% la potencia para llenar la apertura trasera con la intención de solventar estos inconvenientes.

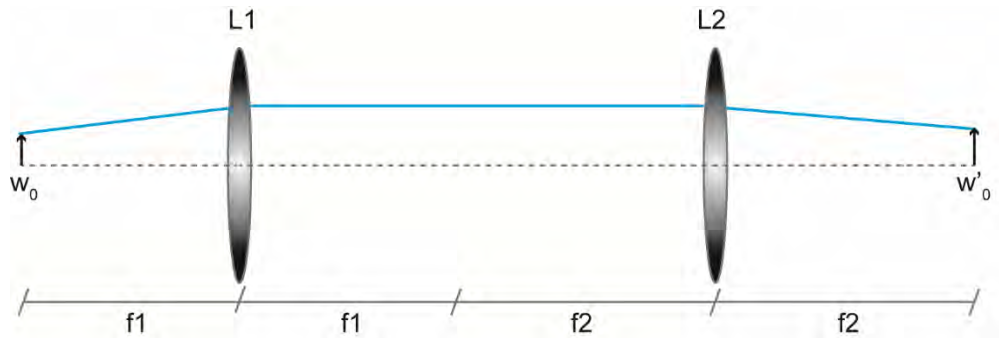


Figura 2.7 Arreglo del telescopio de Kepler utilizado para aumentar la cintura  $w_0$ .

La fórmula general de la intensidad del perfil de un haz Gaussiano es

$$I(r) = I_0 e^{-2\left(\frac{r}{w'_0}\right)^2} \quad (2.15)$$

donde  $I_0$  es la intensidad en el centro del perfil Gaussiano y  $r$  corresponde al radio máximo y  $w'_0$  es la cintura del haz.

La potencia del haz se obtiene integrando  $I(r)$  de 0 a  $r$ .

$$P(x) = I_0 \int_0^r e^{-\frac{r^2}{w_0^2}} dx \quad (2.16)$$

Resolviendo

$$P(x) = P_0 \left(1 - e^{-\frac{r^2}{w_0^2}}\right) \quad (2.17)$$

Donde  $P_0$  es la potencia total del láser.

Al considerar el 95% de la potencia y que la apertura trasera tiene un radio  $r = 3$  mm se tiene que  $r = 1.224w'_0$ , dando como resultado el valor de  $w'_0 = 2.44$  mm. Como el valor del diámetro del haz tiene un valor de  $w_0 = 0.42$  mm se requiere un factor de aumento de 5.88 veces ( $w'_0/w_0$ ). Entonces, para obtener una razón cercana utilizamos una lente de  $f_1 = 50$  mm y una lente con distancia focal de  $f_2 = 300$  mm en el arreglo de Kepler, que de acuerdo a la ecuación (2.14) la magnificación es  $M = 6$ . Este arreglo también se utilizó para conjugar el plano de deflexión del haz en el plano de la apertura de entrada del objetivo como se describe a continuación.

### 2.3 Sistema de barrido láser

Con el fin de comprobar la eficiencia de nuestra propuesta del sistema de control, usamos galvanómetros de bajo desempeño cuya precisión y repetibilidad en la posición se esperaba fuera menor en comparación a las versiones comerciales.

El galvanómetro es un espejo soportado en un actuador de giro electromagnético con el centro de rotación en un eje central del espejo. Cuando el láser incide sobre el espejo forma un ángulo respecto a la normal de la superficie y la componente reflejada forma un ángulo igual respecto a la normal. Al girar el espejo el ángulo de reflexión modificará la dirección del haz reflejado. En este tipo de actuadores el movimiento angular es proporcional a la corriente que se aplica al devanado electromagnético del actuador. Si esta corriente no es estable, las variaciones en esta se traducirán en variaciones en el ángulo de reflexión del haz. Para reducir este efecto se implementó un control de corriente PID igual al empleado en el sistema de iluminación del microscopio invertido.

Sin embargo, la naturaleza electromecánica de este componente añade otro reto al diseño del sistema de control. Supongamos que colocamos frente al sistema de barrido una pantalla donde incide el haz reflejado en una posición inicial  $Ps_0$ , Después modificamos la corriente para cambiar de posición a  $Ps_1$ . Al tratar de alcanzar a  $Ps_1$  la inercia rotacional (o momento angular) del galvanómetro no permitirá que éste se detenga de manera inmediata, por lo que la posición final no corresponderá a la posición solicitada. Lo mismo sucederá con los subsecuentes puntos  $Ps_n$ , situación que tendrá un efecto negativo en la precisión del barrido. Aun cuando se han propuesto soluciones como el de realizar un barrido libre sincronizado con el tiempo de captura, el desgaste de los elementos mecánicos, la vibración del sistema y la deriva mecánica son fuentes de este tipo de errores. La solución propuesta para reducir el error fue realizar una modificación al sistema PID sustituyendo el sensor de corriente por una señal de retroalimentación con un sensor PSD.

### 2.3.1 Caracterización del PSD

Un sensor PSD es un dispositivo semiconductor con un área expuesta sensible al espectro de luz visible, pero con la particularidad de que si en una zona pequeña incide un haz de luz con una intensidad mayor (como es el caso de un láser) al promedio que incide en toda el área del sensor, el dispositivo proveerá 2 señales indicando la posición en el área de mayor intensidad lumínica mediante coordenadas  $(V_x, V_y)$   $V_{CD}$ . La posición central del sensor es el origen del sistema coordenado con un valor aproximado a  $(0,0)$   $V_{CD}$ .

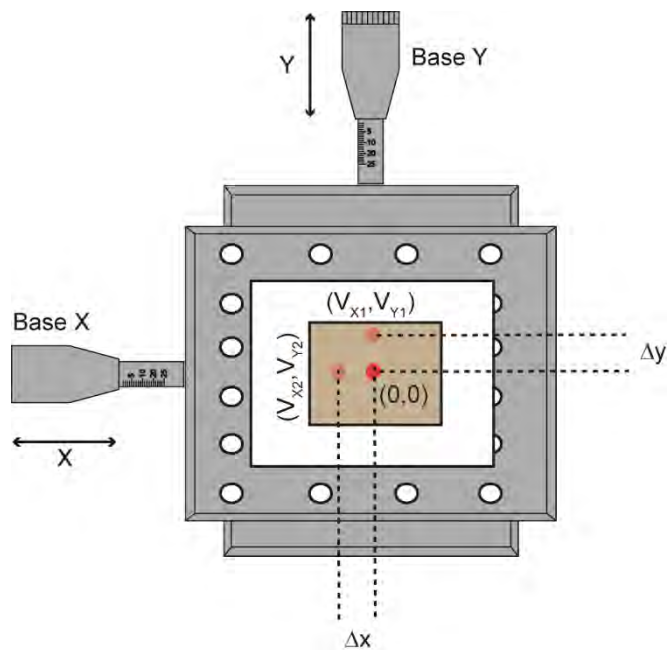


Figura 2.8 Sistema de traslación XY para la caracterización del PSD. El sistema consta de 2 plataformas móviles Base X y Base Y acopladas de manera que formen un sistema de traslación XY. El control de la posición se realizó en forma manual con los tornillos de ajuste. Para determinar la posición y la cuantificación del desplazamiento se tomó como referencia la graduación que provee el sistema de las bases móviles.

Con el fin de determinar la relación que existe entre el voltaje y la posición del haz en la superficie en el sensor (en unidades métricas) realizamos el experimento que se describe a continuación.

Se colocó el PSD en un sistema de traslación XY en la posición central del arreglo como se muestra en la Figura 2.8. El láser se incidió aproximadamente en la

posición (0,0)  $V_{CD}$ . La Base X se desplazó en pasos de  $\Delta x= 150 \mu\text{m}$ ,  $300 \mu\text{m}$  y  $600 \mu\text{m}$ , registrando en cada posición el dato indicado en el micrómetro de la base y el voltaje de salida de PSD ( $V_x,0$ )  $V_{CD}$ . El mismo procedimiento se realizó para el eje Y (0, $V_y$ ).  $V_x$  y  $V_y$  se graficaron en función de la posición  $X_{BASE}$  y  $Y_{BASE}$  respectivamente ajustando los datos a una función lineal del tipo  $y=c+kx$ , donde  $c$  representa la ordenada al origen y  $k$  corresponde a la pendiente de la función.

En las Figuras 2.9a y 2.9b se muestra los datos registrados para  $V_x$  vs  $X_{BASE}$  y  $V_y$  vs  $Y_{BASE}$ , así como sus respectivas curvas de ajuste. El factor de conversión para ambos ejes fue de  $K = V_x / X_{BASE} = V_y / Y_{BASE} = 0.7V / \text{mm}$ .

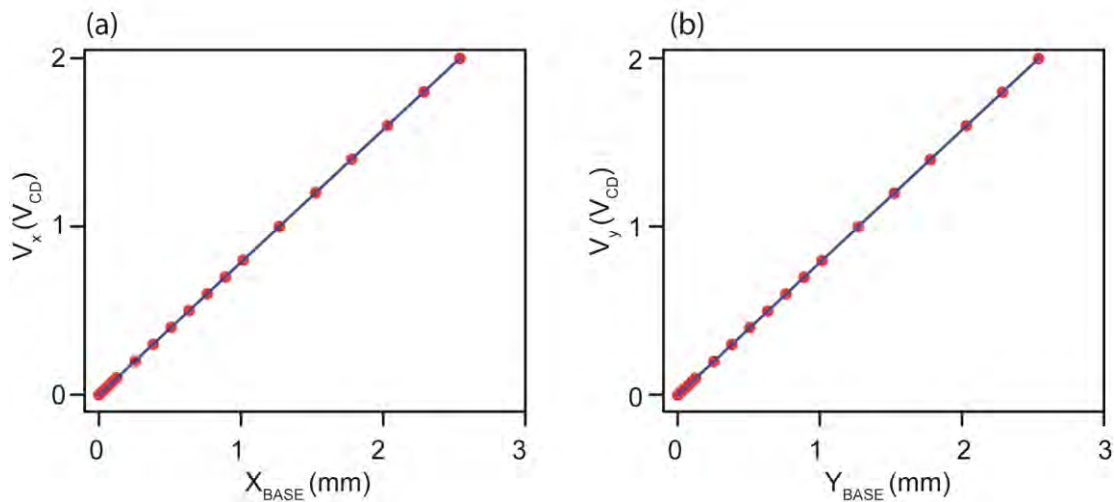


Figura 2.9 Caracterización del sensor PSD. En (a) y (b) se muestra que la relación entre la posición láser en el PSD y el voltaje de salida es lineal en ambos ejes de traslación, con un factor de conversión  $K=0.7V/\text{mm}$  para ambos casos.

### 2.3.2 Caracterización de los galvanómetros

Los galvanómetros utilizados en esta propuesta son de bajo costo (Figura 2.10a) y sus especificaciones técnicas nos son proporcionadas por el fabricante, por lo que surgió la necesidad de calcular la corriente de operación del galvanómetro y su ángulo de rotación ( $\phi$ ) en función de la corriente, datos que en esta etapa del diseño eran necesarios.

En la Figura 2.10b se muestra el esquema del circuito utilizado para calcular el máximo valor de la corriente de operación de los galvanómetros. El principio de



operación es idéntico al del circuito de control de corriente del sistema de iluminación. El valor de la corriente se registró con un multímetro BK TOOL KIT modelo 2706A.

El haz reflejado por el galvanómetro se proyectó en una hoja milimétrica con el fin de tener una referencia del movimiento angular. Después se aplicó una rampa de corriente (iniciando desde 0 A) al galvanómetro del eje X (GALVOX) hasta que se observó que la proyección del haz de luz en la hoja milimétrica no modificaba su posición, considerando que la corriente aplicada correspondía al valor máximo de corriente. Se utilizó el mismo procedimiento para corrientes negativas y para el galvanómetro en el eje Y (GALVOY). La corriente de máxima medida fue de  $\pm 90$  mA en los 2 galvanómetros. Como los puntos máximos de rotación representan los límites de operación de los galvanómetros establecimos como rango de operación en  $\pm 80$  mA.

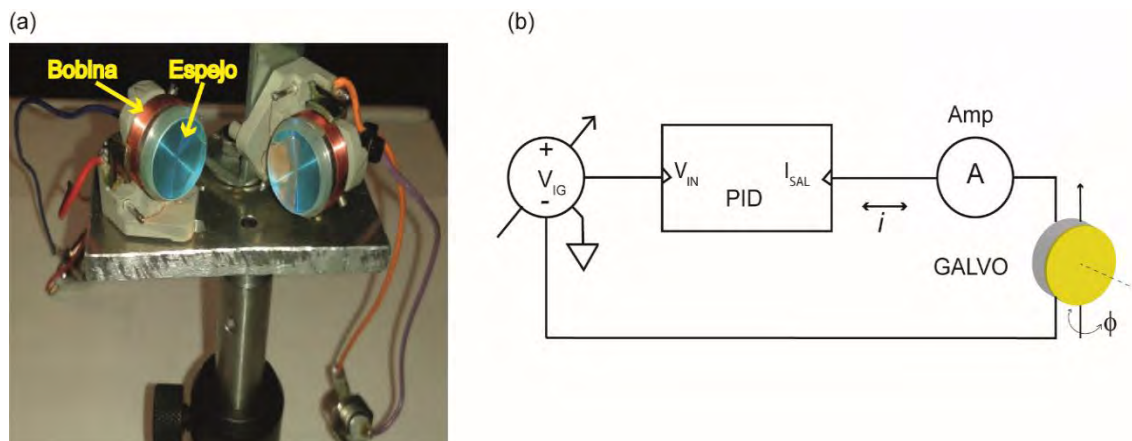


Figura 2.10 Galvanómetros de bajo rendimiento utilizados en el sistema de barrido (a). El esquema en (b) muestra el arreglo de prueba con el que se caracterizó el ángulo de rotación  $\phi$  en función de la corriente  $i$  de los galvanómetros, en el cual se usa un control de corriente PID para alimentar el galvanómetro.  $V_{IG}$ : Voltaje de control, PID: control de corriente PID, Amp: amperímetro, GALVO: galvanómetro.

Después, utilizando el arreglo que se muestra en la Figura 2.11 determinamos la relación del ángulo de rotación en función de la corriente aplicada al galvanómetro. Se consideró la zona de proyección al plano (\*) que se ubica en la posición de la lente L1 ( $f_{L1}=50$  mm) y está conjugado ópticamente en el plano de la superficie del sensor PSD utilizando L2 ( $f_{L2}=75$  mm) y el divisor de luz BS.

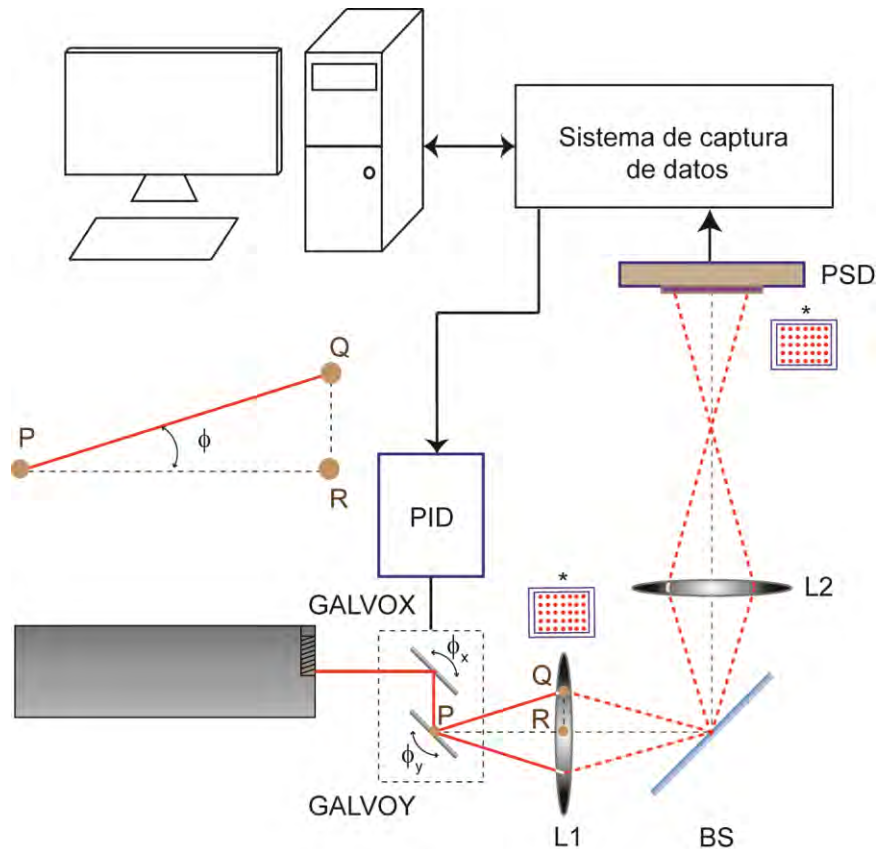


Figura 2.11 Arreglo óptico para caracterizar el ángulo de rotación  $\phi$  de los galvanómetros en función de su corriente de alimentación. Consideramos el plano de la posición de la lente L1 como el plano de proyección del haz (\*), el cual se conjuga ópticamente con el plano del PSD usando la lente L2 y el divisor de luz BS. El registro de los datos de posición en el PSD se realizó con una tarjeta de adquisición de datos PCI 6221 de National Instruments.

El triángulo formado por los segmentos de línea PQ, QR y RP es una representación geométrica de la proyección del haz en el plano de L1 (QR) con el punto de origen en P y el haz del láser (PQ) formando un ángulo  $\phi$  con su proyección en el eje óptico (PR).

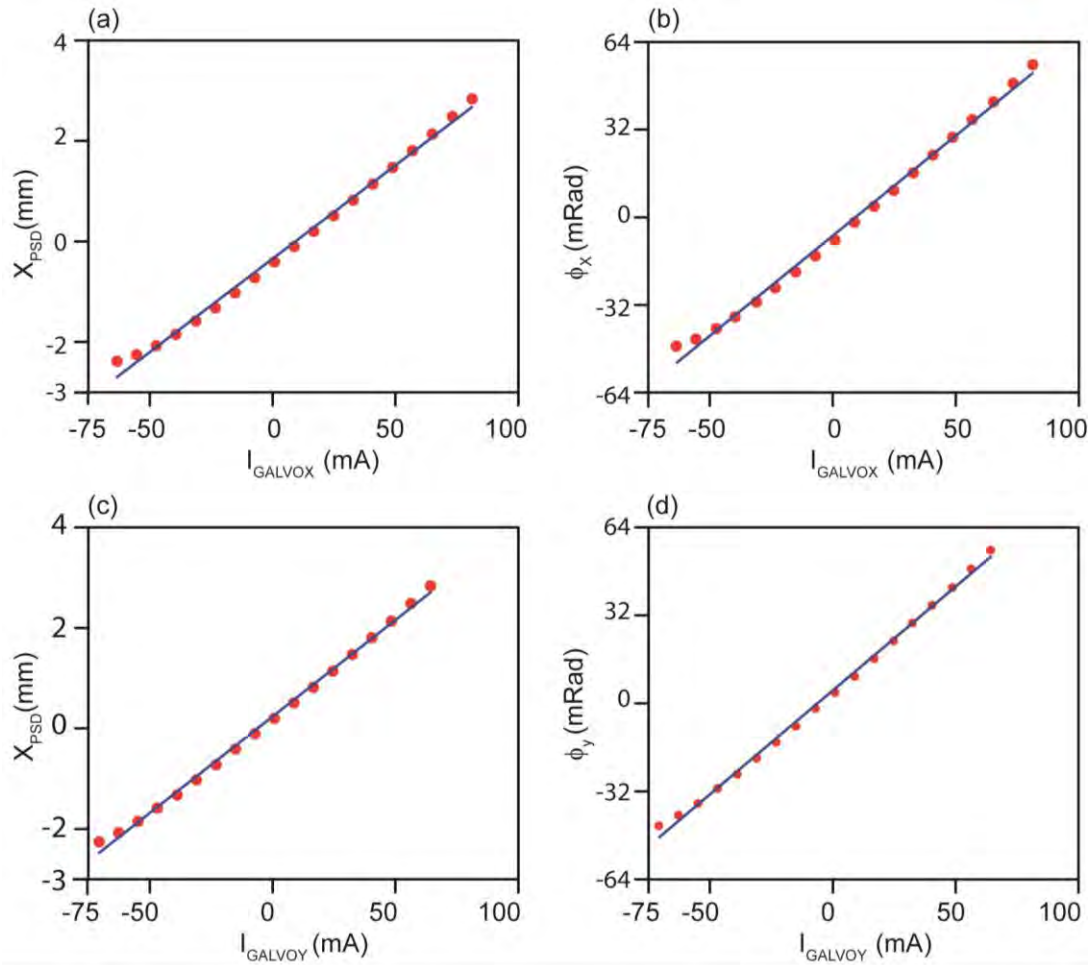


Figura 2.12 Relación de la posición en el PSD y el ángulo de rotación del GALVO vs la corriente  $I_{GALVO}$ . Los factores de calibración de GALVOX son  $k_x = .0371$  m/A (a) y  $k_{\phi_x} = 7.42 \times 10^{-4}$  Rad/A (b), y para GALVOY son  $k_y = .0384$  m/A y  $k_{\phi_y} = 7.67 \times 10^{-4}$  Rad/A.

Si hacemos  $QR = X_{PSD} = Y_{PSD}$  los ángulos de rotación para GALVOX ( $\phi_x$ ) y GALVOY ( $\phi_y$ ) se calculan por las siguientes ecuaciones.

$$\phi_x = \tan^{-1} \frac{X_{PSD}}{f_{L1}} \quad (2.18)$$

$$\phi_y = \tan^{-1} \frac{Y_{PSD}}{f_{L1}} \quad (2.19)$$

Donde  $\phi_x$  y  $\phi_y$  son los ángulos de rotación de los galvanómetros,  $X_{PSD}$  y  $Y_{PSD}$  que corresponden a las posiciones del haz en los ejes del PSD como resultado de la

rotación del GALVOX y del GALVOY respectivamente.  $f_{L1}$  es la distancia focal de la lente L1.

Usamos una metodología similar al que se utilizó para determinar la corriente máxima de los galvanómetros, pero en este caso se registraron los valores de las posiciones  $X_{PSD}$  y  $Y_{PSD}$  así como también la corriente aplicada a los galvanómetros. Los valores de  $X_{PSD}$  y  $Y_{PSD}$  se graficaron en función de sus respectivas corrientes  $I_{GALVOX}$  y  $I_{GALVOY}$  ajustándolas posteriormente a una función lineal, véase la Figura 2.12. Para la relación corriente-posición en el PSD los parámetros calculados son  $k_X = .0371$  m/A y  $k_Y = .0384$  m/A (Figuras 2.12a, c). En el caso de la relación corriente-ángulo de rotación se tiene que los factores son  $k_{\phi_X} = 7.42 \times 10^{-4}$  Rad/A y  $k_{\phi_Y} = 7.67 \times 10^{-4}$  Rad/A (Figuras 2.12b, d).

Hasta el momento la referencia del barrido se ha hecho respecto al plano de la superficie del sensor. A continuación, se describe el análisis de la proyección del barrido del haz en el plano de la muestra de nuestro sistema experimental.

### 2.3.3 Barrido del láser en el plano de la muestra

Con el fin de simplificar la explicación del barrido del haz laser en el plano de la muestra, se hace la consideración de que el sistema óptico del objetivo es una sola lente con una distancia focal  $f_{obj}$ , distancia donde se considera que se ubica el plano de la apertura trasera del objetivo.

De acuerdo a la ecuación 2.5, la resolución de nuestro sistema experimental es de  $res_{xy} \approx 292$  nm ( $NA=1.30$   $\lambda=632.8$  nm), valor que también define el desplazamiento mínimo del haz en el plano de la muestra ( $D_m$ ). En base a este valor determinamos el ángulo mínimo de rotación que requiere el sistema de barrido.

Al conjugar ópticamente el plano de rotación ( $C_1$ ) de los galvanómetros con el plano de la apertura trasera del objetivo (véase la Figura 2.13) relacionamos los ángulos de rotación  $\theta_2$  y  $\theta_1$  con la expresión

$$\theta_2 = \theta_1 / M \quad (2.20)$$

donde M es la magnificación del arreglo óptico de Kepler.

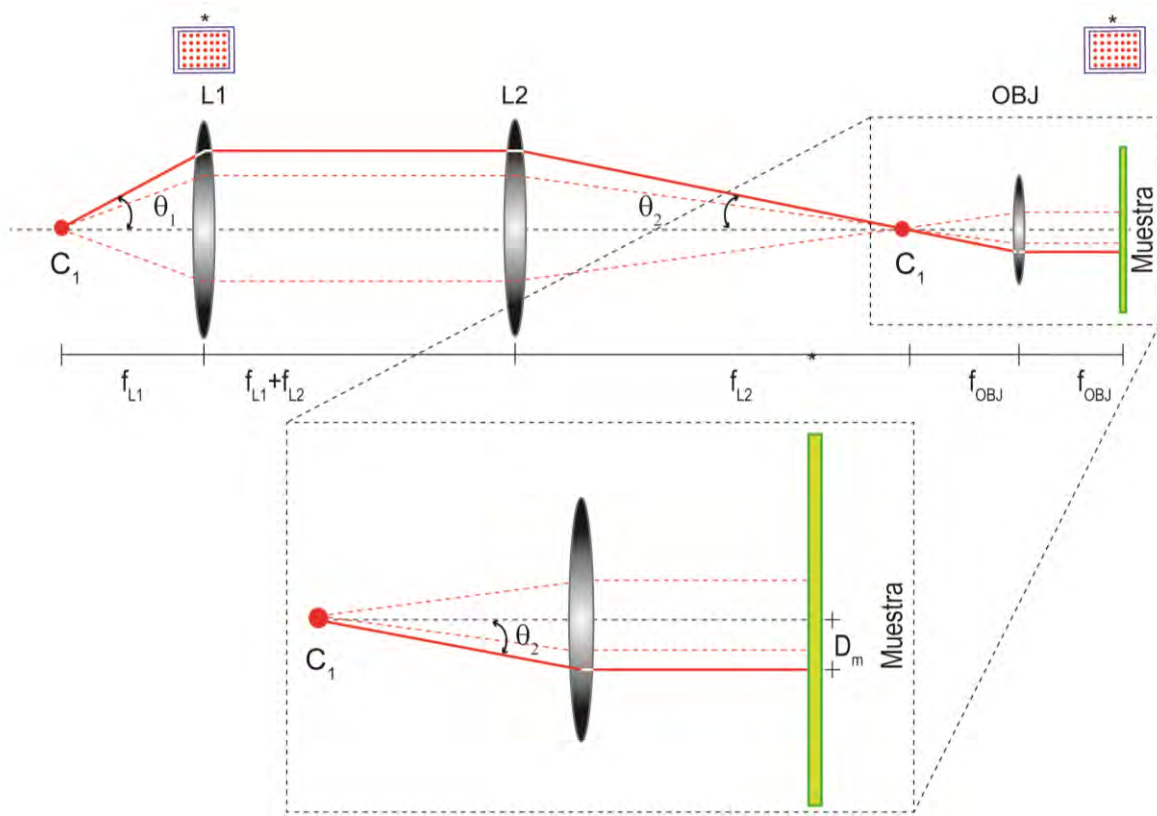


Figura 2.13 El eje del barrido en los galvanómetros se conjuga ópticamente con la apertura trasera del objetivo ( $C_1$ ), y como consecuencia se conjuga ópticamente el plano de la muestra con el plano de proyección de L1 (\*), así como también con el plano del sensor PSD (no mostrado en este esquema). L1= Lente convexa  $f_{L1}=50$  mm, L2: Lente convexa  $f_{L2}=300$  mm, OBJ: Objetivo 100X  $f_{OBJ}= 2$  mm.

Como  $C_1$  se ubica en  $f_{obj}$ , la proyección del barrido del haz en OBJ se conjuga ópticamente en el plano de la muestra y por consecuencia se conjuga ópticamente con el plano del sensor PSD. Entonces el desplazamiento  $D_m$  será ópticamente conjugado en el plano del PSD.

El ángulo de rotación  $\theta_2$  en función de  $D_m$  está definido por la expresión

$$\theta_2 = \tan^{-1} \frac{D_m}{f_{OBJ}} \quad (2.21)$$

sustituyendo 2,21 en 2.20 se obtiene que

$$\theta_1 = M \tan^{-1} \frac{D_m}{f_{obj}} \quad (2.23)$$



Al considerar los valores propuestos de  $f_{L1}= 50$  mm,  $f_{obj}=2$ mm y  $M=6$ , además de los factores calculados  $k$ ,  $k_x$  y  $res_{xy}$ , se obtuvo que para desplazar el haz en el plano de la muestra una distancia de  $D_m=292$  nm es necesario aplicar una corriente al galvanómetro de  $I_{GALVOX}=1.2$  mA (13 mV al control PID). El resultado es aplicable también al eje Y.

## 2.4 Prueba de desempeño del sistema de barrido con PID

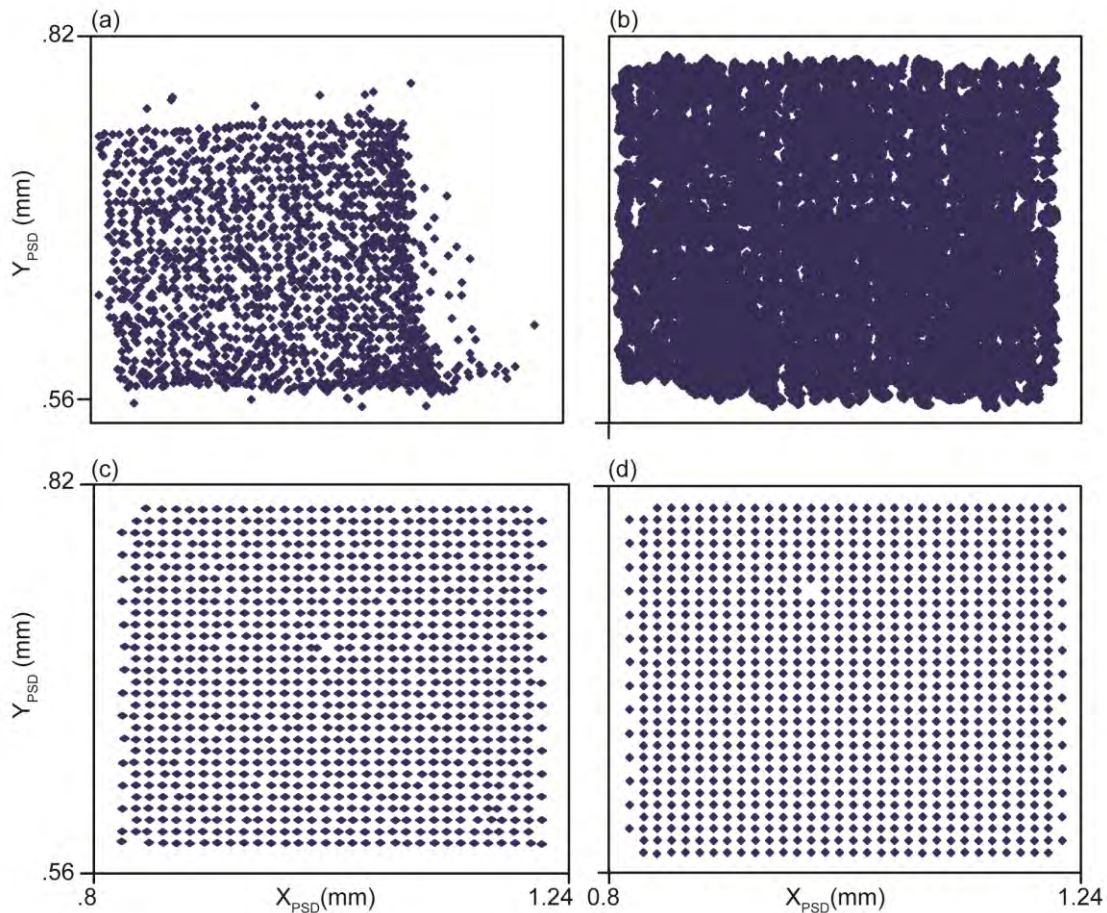


Figura 2.14 Prueba experimental del sistema de barrido. (a) Barrido del haz en el PSD sin control PID y tiempos de posicionamiento de 0.5, y (b) con un  $t_p=1$  s. Para (c) y (d) incluimos el control PID en tiempos de 0.5s y 1 respectivamente.

El análisis presentado en los párrafos anteriores sugiere que el sistema de barrido tiene una mejora significativa en ubicar la proyección del haz en el PSD como resultado de la integración del control PID. Con el objetivo de comprobarlo, realizamos una prueba de desempeño del sistema de barrido en la misma

plataforma de la Figura 2.11. Se realizó un barrido de 30 X 30 puntos con una separación de 48  $\mu\text{m}$  en ambos ejes del PSD; con las siguientes condiciones: (a) sin control PID y tiempo de cambio de posición ( $t_p$ ) de 0.5 s, (b) sin control PID y  $t_p = 1$  s, (c) con control PID con  $t_p= 0.5$  s y (d) con control PID y  $t_p= 1$ seg.

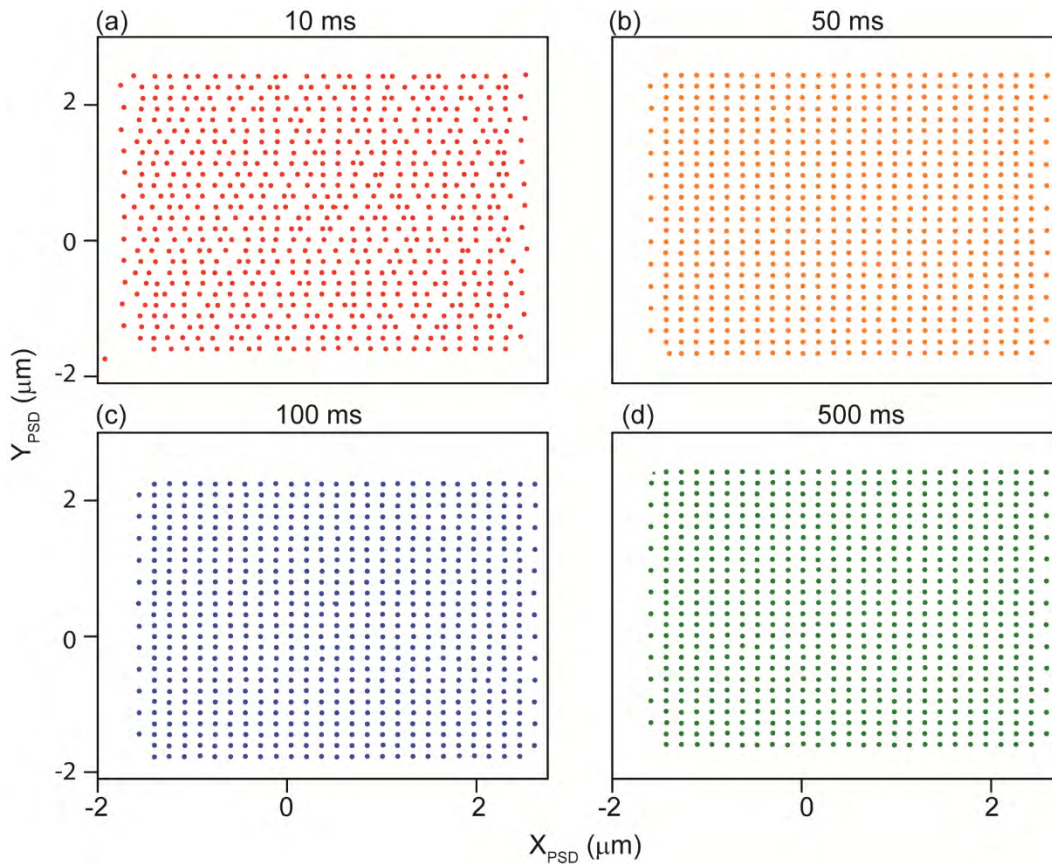


Figura 2.15 Mapas de posición del sistema de barrido láser para tiempos de: a)  $t_p=10$  ms, b)  $t_p=50$  ms, c)  $t_p=100$  ms y d)  $t_p=500$  ms.

Los resultados de esta prueba se muestran en la Figura 2.14, observándose que el barrido sin control PID no presenta una distribución espacial homogénea de los puntos en el PSD, Figuras 2.14a y 2.14b. Al realizar el mismo barrido pero ahora con el control PID se observa que la distribución espacial es corregida formando una cuadrícula homogénea de puntos que representan las posiciones del haz en el PSD (Figuras 2.14c y 2.14d).

Repetimos la prueba anterior pero ahora con tiempos menores de  $t_p= 10$  ms, 50 ms, 100 ms y 500 ms. Como se observa en la Figura 2.15a, cuando  $t_p= 10$  ms el

sistema PID presenta inconsistencia en el barrido al no lograr ubicarse en las posiciones solicitadas. En el caso contrario cuando  $t_p \geq 50$  ms el mapeo es más homogéneo en la distribución de las posiciones (Figuras 2.15b, c, d).

## 2.5 Sistema de microscopía confocal

En base a los resultados obtenidos anteriormente realizamos la propuesta del diseño de nuestro sistema de microscopía confocal que se muestra en la Figura 2.15. Aunque ya se ha descrito la operación de varios de los módulos que forman parte de esta propuesta haremos un resumen del principio de operación de todo el sistema.

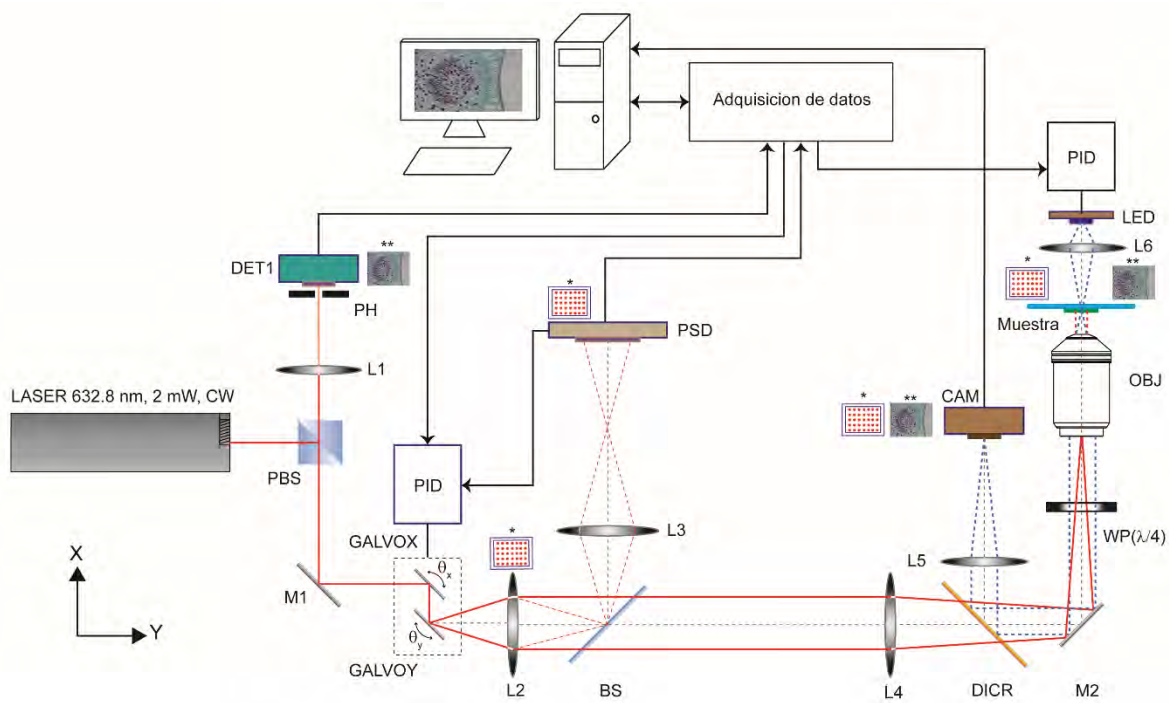


Figura 2.16 Sistema mínimo de microscopía confocal. La lista de componentes y la descripción de su principio de operación se muestra en el texto.

La lista de componentes del sistema confocal y su descripción es la siguiente.

Componente	Descripción	Proveedor/No. de parte
Láser	Láser He-Ne 632.8 nm, 2 mW, EP lineal, CW	MELLES GRIOT



<b>PBS</b>	Separador óptico polarizado (50:50)	THORLABS PBS121
<b>WP</b>	Lamina de retardo $\lambda/4$ Ø12.7 mm	THORLABS WPMH05M-633
<b>BS</b>	Separador óptico (50:50) Ø 52 mm	THORLABS BSW16
<b>DICR</b>	Espejo dicróico pasa alto	THORLABS DMLP605R
<b>L1</b>	Lente convexa $f_{L1}= 50$ mm Ø 25.4 mm	THORLABS LA1131-A
<b>L2</b>	Lente convexa $f_{L2}= 50$ mm Ø 25.4 mm	THORLABS LA1131-A
<b>L3</b>	Lente convexa $f_{L3}= 75$ mm, Ø 25.4 mm	THORLABS LA1608-A
<b>L4</b>	Lente convexa $f_{L4}= 300$ mm Ø 25.4 mm	THORLABS LA1484-A
<b>L5</b>	Lente convexa $f_{L5}= 100$ mm Ø 1"	THORLABS LA1509-A
<b>L6</b>	Lente convexa $f_{L6}= 30$ mm, D=1"	THORLABS LA1805-A
<b>DET</b>	Fotomultiplicador CEA-59RX	CETRON
<b>PSD</b>	DL100-7-PCBA2	PACIFIC SILICON SENSOR

<b>CAM</b>	Cámara de microscopía MU-300 1536 X 2048 px.	AMSCOPE
<b>OBJ</b>	Objetivo 100X, NA 1.3, corrección al infinito, inmersión en aceite	ZEISS PLAN NEOFLUOR
<b>LED</b>	LED de alta potencia, IF=300 mA, P= 3W, $\lambda=470$ nm	LUXEON

El microscopio de campo claro invertido formado por OBJ, L5, M2, DICR y la cámara CMOS tiene como función mostrar el campo visual de la muestra bajo estudio, lo que permite determinar la región de interés que será capturado por el sistema confocal. La fuente de luz de esta sección tiene una configuración de iluminación crítica formado por el LED ( $\lambda=460$  nm) y L6 ( $f_{L1}= 30$  mm).

La información del microscopio de campo claro y la del microscopio confocal se separa con un espejo dicróico (DICR) el cual refleja el espectro de luz que corresponde al intervalo 380nm-490 nm y transmite el intervalo de 520 nm-700 nm, es decir la información que proviene del microscopio invertido incide en la cámara CAM mientras que la iluminación del láser es transmitida sin modificar la trayectoria de propagación.

Ahora bien, considerando la operación del sistema confocal se describe a continuación su funcionamiento, el láser se incide en el PBS de manera tal que su EP lineal coincida con el eje de polarización horizontal de reflexión del PBS, para propagarse por el camino óptico principal formado por M1, GAVOX, GALVOY, L2, L4, DICR, WP y OBJ. Al pasar por WP( $\lambda/4$ ) el láser cambia a un EP circular e incide a través de OBJ sobre la muestra. La luz reflejada por la muestra retorna por el mismo camino óptico principal, manteniendo el EP circular hasta que incide en WP( $\lambda/4$ ) nuevamente, el cual lo cambia a un EP lineal pero paralelo al eje vertical de transmisión del PBS, propagándose a través de él hasta llegar al sensor DET1 que se encuentra ubicado en el foco de L1. Como ya hemos comentado anteriormente este arreglo asegura que el haz incida sobre DET1 en su totalidad.

En esta arquitectura se asegura que el plano de proyección del barrido (\*) sea ópticamente conjugado en el plano del sensor PSD y el plano de la muestra. También el plano de la muestra (\*\*) es ópticamente conjugado al plano de la cámara y al plano de sensor DET1.

La computadora tiene como función principal el tomar la información que proviene de DET1, la cual la almacena y procesa para formar la imagen final además de sincronizar y controlar las funciones del sistema del microscopio confocal.

Los resultados que hemos presentado en este capítulo muestran la inclusión de un sistema de control PID (y utilizar una señal de registro de posición como retroalimentación en un sistema de barrido láser) estabiliza la corriente en los galvanómetros y su posición. Esta mejora incrementa de manera significativa la precisión en el barrido del haz en el plano del sensor PSD formando mapas de posición con una distribución homogénea de los inter-espacios. Consideramos también que el diseño propuesto puede reducir el ruido que afecta la posición del haz y que proviene de vibraciones mecánicas, temperatura, etc.

En relación a los galvanómetros, el tiempo de respuesta fue menor a lo esperado, considerando el del control PID fue de  $t=4.6 \mu\text{s}$  mientras que el del sistema de barrido fue de  $t\approx 50 \text{ ms}$ . Bajo esta condición estos galvanómetros no se consideran útiles en un sistema confocal ya que los tiempos de captura de una imagen pueden ser largos en comparación a los que se reportan en el estado del arte. Como propuesta de solución se contempla el uso de microespejos ya que sus características como la frecuencia de operación superan al de los galvanómetros utilizados en este trabajo.

# Capítulo 3

## Remoción de la aberración cromática lateral en imágenes de microscopía de campo claro

Los microscopios generan imágenes defectuosas por las aberraciones originadas por las propiedades ópticas intrínsecas de sus componentes. La aberración cromática lateral (ACL) [87] se ha corregido incorporando material que compensa la dispersión de la luz en los sistemas ópticos [20]. Sin embargo la reducción del costo de los sistemas de formación de imagen, la necesidad de un alto grado de corrección o la conveniencia de usar materiales de baja calidad que son propensos a inducir aberraciones ha motivado la búsqueda de alternativas para remover la ACL. La estrategia más utilizada para tal fin es el procesamiento digital de imágenes seguida por los sistemas híbridos óptico-digitales [88].

En el contexto del registro de imágenes digitales la ACL induce desplazamientos relativos entre los correspondientes píxeles de los canales rojo, verde y azul (RGB) [89]. A partir de este hecho surgen 2 efectos negativos principales: las variables que dependen de la posición de los píxeles son capturadas incorrectamente; además en las imágenes aparecen bordes de color desplazados en las fronteras de los objetos que afectan la correcta caracterización de la morfología, los límites y el contenido de color [90]. Para remediar estos inconvenientes se han propuesto métodos como el ajuste global de imagen o *image warping*, que consta de 2 etapas [91]. Primero, el sistema óptico es calibrado usando una o más imágenes de alto contraste en las que se determinan los parámetros que caracterizan el grado de desviación de las posiciones de los píxeles entre los diferentes canales de color. En la segunda etapa los parámetros de calibración son usados para realinear los canales de color digitalmente [92]. Alternativamente se han desarrollado métodos

de corrección basados en la detección de gradientes [93], deconvolución de la función de esparcimiento del punto (*Point spread function* o PSF) [94], y el modelado analítico de la ACL [95].

En el campo de la microscopía óptica los objetivos de fluorescencia brindan un alto grado de corrección de la aberración cromática, admitiendo errores de ~0.2% [26]. Aun así, este valor no es suficiente en varias aplicaciones, particularmente donde es necesario calcular las variables de posición en el rango de sub-píxeles [96-98]. En un ejemplo donde se han implementado técnicas de corrección de ACL en la microscopía de fluorescencia, Kozubek y Matula [99] capturaron primero imágenes de microesferas multi-etiquetadas y extrajeron los factores de desplazamiento de los píxeles entre los canales de color desalineados. Luego, los factores calculados se usaron para ajustar 2 de los canales a un canal de referencia, reduciendo la magnitud de la aberración cromática desde ~240 nm a ~10 nm lateralmente y desde ~300 nm a ~60 nm axialmente. Este procedimiento es relativamente simple y ha sido aplicado exitosamente en estudios donde la precisión en el cálculo de la distancia entre 2 genes etiquetados se han mejorado significativamente [96].

En contraste, en el contexto de la microscopía de campo claro se han realizado pocos esfuerzos para lograr una mayor remoción de la ACL más allá de la que proporcionan los objetivos. Tucker *et al.* reportaron el uso de técnicas de procesamiento digital de imágenes en conjunto con una máscara de fase para extender la profundidad del campo de enfoque y proveer el control sobre la aberración cromática axial [100]. Aunque ha recibido menos atención comparada con la microscopía de fluorescencia la mejora en la calidad de las imágenes en la microscopía de campo claro es de gran interés, notablemente para su uso en análisis de especímenes biológicos. Por ejemplo, donde se requieren evaluaciones precisas de características como fronteras, texturas y contenido de color en imágenes histológicas de muestras de tejidos [6, 19]. En estudios de clasificación de partículas es necesario que las imágenes estén libres de aberración [101, 102].

En este capítulo presentamos el desarrollo de una alternativa eficiente para remover la aberración cromática lateral en imágenes capturadas en sistemas de microscopía de campo claro. Usando un multiplexor óptico como fuente de iluminación en un microscopio comercial modificado, capturamos imágenes monocromáticas en forma secuencial con diferentes colores: rojo, verde, azul y blanco. La medida del desplazamiento de marcas fiducias en los canales rojo y verde respecto a marcas fiducias en el canal azul nos proporcionaron los factores de calibración, los cuales fueron usados en imágenes de prueba para realinear los canales de color digitalmente. La efectividad del método se comprobó evaluando la posición y fronteras de los objetos en imágenes de patrones de calibración y por la evaluación del contenido de color en muestras biológicas teñidas antes y después de la corrección de la ACL.

### **3.1 Desarrollo del método de corrección de la ACL**

El esquema general de nuestra metodología se muestra en la Figura 3.1. Después de la etapa de calibración (no presente en el esquema), una imagen capturada bajo iluminación blanca (**W**) es separada en sus componentes rojo (**R**), verde (**G**) y azul (**B**). Seleccionamos la imagen **B** como el canal de referencia para la subsecuente corrección sin realizar alteración alguna a la misma. Aplicamos el algoritmo de corrección a los canales **R** y **G**, para reducir el desalineamiento de la posición de los píxeles respecto al canal **B**. Finalmente usamos los canales **R** y **G** corregidos con el canal **B** original para reconstruir la imagen pero ahora con la ACL corregida.

#### **3.1.1 Construcción del sistema experimental**

Para implementar nuestra estrategia, seleccionamos un microscopio de grado estudiantil en modo de campo claro (Iroscope, M6-11T). Esta opción provee la oportunidad de observar como la ACL de un sistema óptico modesto (sin iluminación Köhler, con objetivos plan-acromáticos simples, sin puerto de cámara dedicado, etc.) puede ser revertido a través del método de ajuste digital de imagen. La fuente original de iluminación fue reemplazado por un multiplexor óptico [103] ( véase la Figura 3.2).

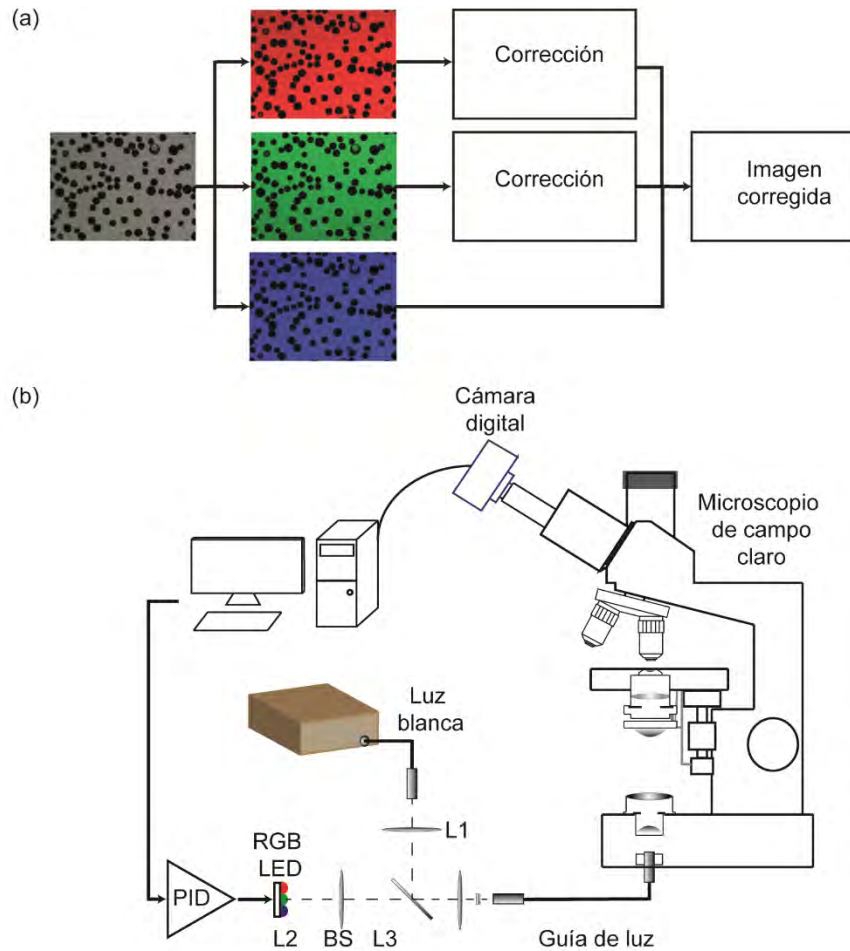


Figura 3.1 Estrategia para eliminar la ACL en imágenes de microscopía de campo claro. (a) diagrama de flujo de nuestra estrategia para corregir las imágenes de microscopía. (b) esquema del sistema experimental utilizado. L1, L2: lentes  $f=50$  mm L3= Lente  $f=25$  mm, BS: separador óptico, PID: circuito de realimentación de corriente Proporcional-Integral Derivativo.

La luz de un LED de alta potencia (Multicomp, OSW-8339) que contiene 3 chips de diferentes longitudes de onda (620 nm, 520 nm and 460 nm) y la luz de una lámpara de tungsteno se acoplaron a una guía óptica (Edmund Scientific, Model No. 53-391) por medio de un telescopio de Kepler y un divisor de luz facilitándonos la capacidad de iluminar secuencialmente con rojo, verde, azul y luz blanca. La estabilidad en la iluminación en un ancho de banda de  $\sim 1$  kHz fue llevado acabo por un sistema de control retroalimentado de corriente [71, 74].

El control de encendido/apagado e intensidad de la iluminación LED se realizó usando un módulo de adquisición de datos (National Instruments, NI-9221)

manejado con rutinas de LabVIEW. Para capturar las imágenes colocamos una cámara CMOS (AMSCOPE, MU-300, 2048 × 1536 píxeles). Todo el trabajo presentado en esa sección se realizó con un objetivo 10X.

### 3.1.2 Calibración del sistema experimental

Para determinar la proporción de ALC en las imágenes obtuvimos la posición de marcas de referencias bajo iluminación con diferentes longitudes de onda. Para ello fabricamos un patrón de prueba fijando microesferas de poliestireno con tamaños entre 40 y 90  $\mu\text{m}$  a un portaobjetos utilizando pegamento transparente de mucilago (Stafford), resultando en un patrón con una distribución aleatoria de esferas. Después capturamos imágenes de nuestro patrón personalizado usando secuencialmente iluminación roja, verde y azul en intervalos de 1s. Este procedimiento secuencial proveyó una base segura para probar cada canal de color de la cámara, así como también minimizar los efectos de la superposición óptica [104] y la interpolación cromática [46, 105] durante la captura de las imágenes digitales. Para cada imagen capturada su correspondiente canal de color fue extraído generando su versión monocromática para cada canal de color (rojo, verde y azul).

Para determinar la magnitud de la ACL, obtuvimos primeramente las coordenadas  $(X_i^M, Y_i^M)$  del centroide para cada  $i$ -ésima esfera presente en el campo visual de cada canal ( $M = \mathbf{R}, \mathbf{G}, \mathbf{B}$ ). Esta operación se desarrolló fácilmente (debido al alto contraste de las esferas) realizando los siguientes pasos: (1) la separación de las esferas al definir de un umbral de segmentación, (2) la conversión de la imagen de escala de grises a una imagen binaria y (3) el cálculo de las coordenadas de los centroides de las esferas en la imagen binaria. El contenido de ACL es entonces medido en pares de canales como la distancia Euclidiana entre los centroides de una determinada esfera en los canales  $\mathbf{B}$  y  $\mathbf{R}$  ( $\mathbf{B-R}$ ):  $\Delta X_i^{BR} = X_i^B - X_i^R$ , y entre los canales  $\mathbf{B}$  y  $\mathbf{G}$  ( $\mathbf{B-G}$ ):  $\Delta X_i^{BG} = X_i^B - X_i^G$ . Estos procedimientos se realizaron en MATLAB.

La distribución de la magnitud de la ACL encontrada en nuestro sistema se presenta en la Figura 3.2, donde las distancias de los pares  $\mathbf{B-R}$  (Figura 3.2a) y  $\mathbf{B-G}$



(Figura 3.2b) revelan una superficie semi-cónica lo que indica un punto de ACL mínimo (alrededor del mismo punto en ambos casos) y una distribución lineal creciente hacia los límites del campo visual. En el caso del par **B-R** se calculó un máximo de ~12 píxeles, mientras que el par **B-G** se registró un valor máximo de ~6 píxeles. Una representación vectorial del corrimiento debido a la ACL se muestra en las Figuras 3.2c y 3.2d donde queda definida claramente la naturaleza radial de la ACL en nuestro caso (este comportamiento no siempre ocurre, véase por ejemplo la referencia [99]).

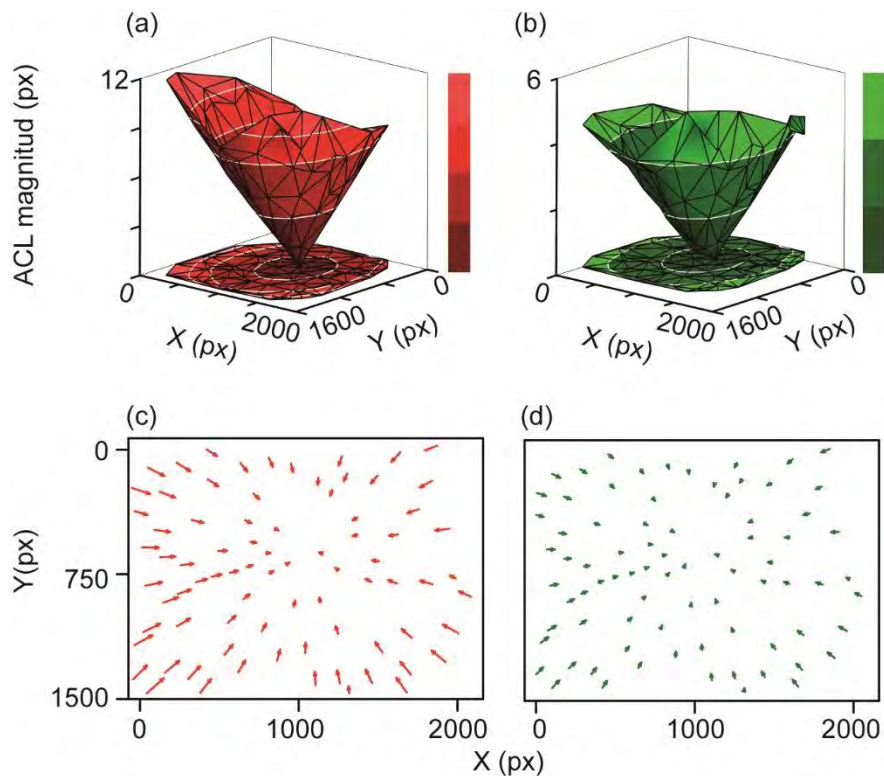


Figura 3.2 La magnitud evaluada de ACL en nuestro microscopio. Los gráficos 3D muestran un comportamiento radial-lineal de la magnitud de la ACL en los caso de (a) B-R y (b) B-G. Las correspondientes gráficas de vectores muestran los desplazamientos relativos en las posiciones de las microesferas de prueba entre los canales (d) B-R y (c) B-G. La magnitud de los vectores en (c) y (d) fue magnificada por 10 para mayor claridad.

Las gráficas de  $\Delta X$  vs.  $X^B$  y  $\Delta Y$  vs.  $Y^B$  para los pares **B-R** (Figura 3.3a y Figura 3.3b) y **B-G** (Figura 3.3c y Figura 3.3d) fueron ajustadas a funciones lineales de las cuales obtuvimos las pendientes y puntos de intersección ( $\Delta X, Y=0$ ), dando un total de 8 parámetros de calibración. Para las distancias de **B-R** se encontró que  $k_{BR} = -$

0.011 para  $\Delta X$  y  $\Delta Y$ , mientras que para las distancias **B-G** fue  $k_{BG} = -0.0052$  para  $\Delta X$  y  $\Delta Y$ . Las coordenadas que corresponden al punto de contenido mínimo de ACL fueron  $(m_{BR}, n_{BR}) = (1051, 677)$  px para el par **B-R** y  $(m_{BG}, n_{BG}) = (1079, 639)$  px para el par **B-G**. El eje óptico de nuestro sistema no coincide con el punto mínimo de la imagen capturada indicando simplemente que las partes constitutivas de nuestro microscopio pueden no ser radialmente simétricas o no estar alineados perfectamente.

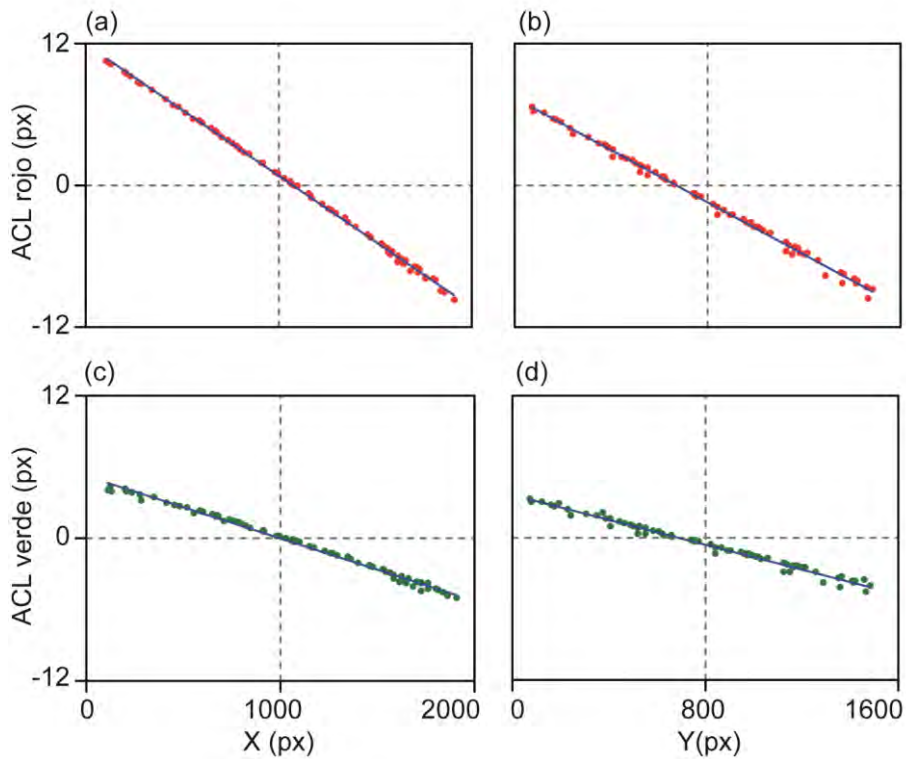


Figura 3.3 Evaluación de los factores de corrección de la ACL. Las componentes (a)  $\Delta X$  y (b)  $\Delta Y$  para las distancias **B-R** hacen evidente un comportamiento lineal con una pendiente negativa de  $k_{BR} = -0.011$  en ambos casos. En (c)  $\Delta X$  y (d)  $\Delta Y$  las componentes de las distancias **B-G** también son lineales con una pendiente  $k_{BG} = -0.0052$ . Se obtuvo un valor del factor Pearson de  $-0.99$  en todos los casos. Puntos: datos; líneas: ajuste de los datos.

### 3.1.3 El algoritmo de corrección

Usando los parámetros de calibración previamente encontrados, desarrollamos un algoritmo elemental de ajuste digital de imagen acorde a las ecuaciones siguientes:

$$I_{(m',n')}^{new} = I_{(m,n)}^{old} \quad (3.1)$$

$$m' = m + \text{floor}(k_{BR} \times (m - m_{BR})) \quad (3.2)$$

$$n' = n + \text{floor}(k_{BR} \times (n - n_{BR})), \quad (3.3)$$

para la corrección del canal **R** relativo al **B**. En las ecuaciones (3.1) – (3.3)  $I^{new}$  y  $(m', n')$  denotan la intensidad (conteo de pixeles) y las posiciones de pixeles en el plano  $(X, Y)$  respectivamente de la nueva imagen. De igual manera,  $I^{old}$  y  $(m, n)$  son la intensidad y posiciones de pixeles respectivamente de la imagen original. En este punto, aprovechamos el hecho de que la pendiente de las gráficas  $\Delta X$  vs.  $X^B$  y  $\Delta Y$  vs.  $Y^B$  poseen el mismo valor ( $k_{BR}$ ). La función  $\text{floor}(\text{valor})$  redondea el elemento  $\text{valor}$  al entero cercano menor o igual a  $\text{valor}$ . Un procedimiento similar se siguió para corregir el canal **G** relativo a **B** usando sus respectivos parámetros.

En el algoritmo de corrección los valores estimados para las nuevas posiciones de los pixeles son redondeados y truncados a enteros lo cual conduce a la pérdida o sobrerrepresentación de pixeles que tienden a erosionar la imagen y deteriorar la nitidez. Para reducir estos efectos indeseados adicionamos un algoritmo de interpolación bilineal después de la corrección [106].

### 3.2 Pruebas experimentales de la remoción de la ACL en campo claro

Para demostrar la efectividad de nuestro método de corrección de la ACL, evaluamos diferentes características de las imágenes: 1) el perfeccionamiento en la definición de las fronteras en los elementos de una imagen, 2) la evaluación cuantitativa de los niveles de reducción de la ACL, 3) el registro fiel del contenido de color, y 4) la precisión en la medición de morfologías.

#### 3.2.1 El perfeccionamiento en la definición de los límites de los elementos de una imagen

Capturamos una imagen de un patrón de prueba USAF 1951 usando iluminación blanca provista por la fuente de tungsteno en el arreglo multiplexor-fibra y seleccionamos un grupo de barras patrón con un tamaño de  $87.7\mu\text{m} \times 17.5\mu\text{m}$  para su análisis. La imagen original (Figura 3.4a) muestra un conjunto de bandas de color en las fronteras de las barras que son claramente removidas después del procedimiento de corrección de la ACL (Figura 3.4b). Las bandas indeseables de color son la evidencia de como los perfiles de intensidad a través de las barras muestran un desalineamiento entre los canales **R**, **G** y **B** (Fig. 3.4c). Después de la

corrección los perfiles de intensidad para todos los canales de color recobran su alineación resultando en el incremento de la nitidez (Fig. 3.4d).

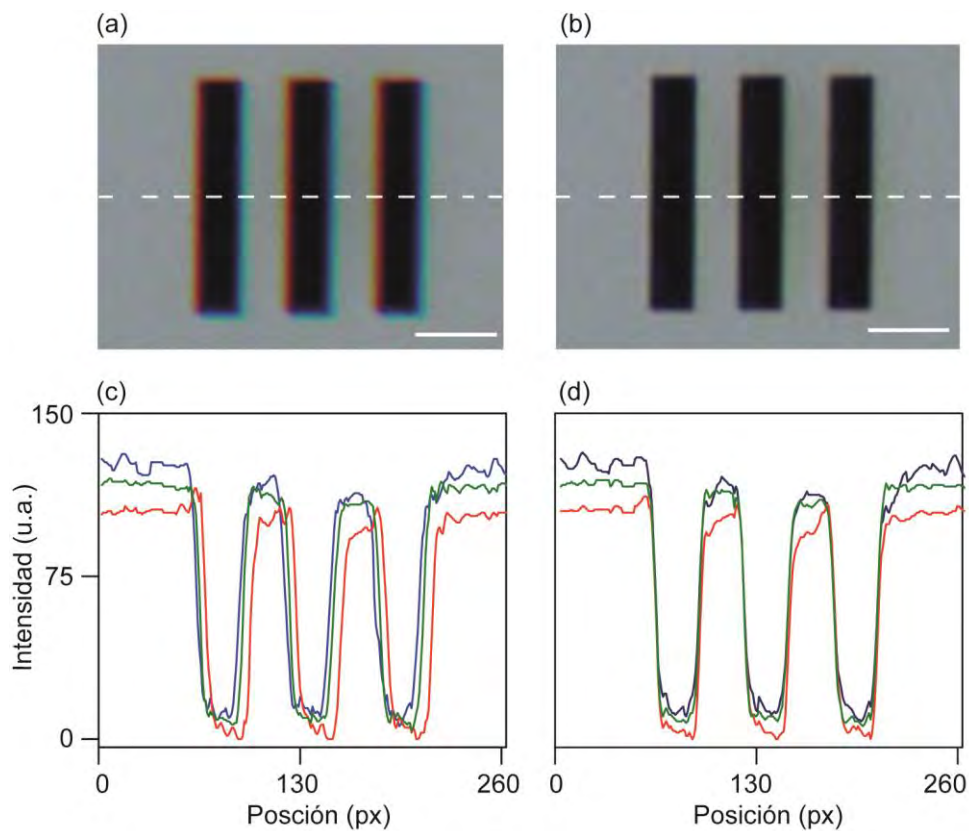


Figura 3.4 Efectos de la corrección de la ACL en los límites de objetos. Imágenes de un patrón USAF 1951 (a) antes y (b) después de la corrección de la ACL. (c) Los perfiles de la intensidad de píxel de los canales de color a través de una sección transversal (línea discontinua blanca) hacen evidente el desalineamiento entre los canales de color de la imagen original. (d) Los perfiles correspondientes en la imagen corregida muestran que se ha eliminado el desalineamiento. Escala de la barra: 50 px (30  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.2 Evaluación cuantitativa de los niveles de reducción de la ACL

En este experimento capturamos la imagen de una retícula de calibración bajo iluminación blanca y determinamos la posición de las líneas de referencia en la imagen de la retícula antes y después de la corrección. En estas imágenes aplicamos un procedimiento similar al descrito para las partículas esféricas en la sección 2 para obtener las coordenadas de los centroides ( $X_i, Y_i$ ) de las líneas a lo largo de los ejes X y Y (véase la Figura 3.5a). Para el eje X, la distancia  $d_i = X_i - X_0$  (donde  $X_0$  es un punto de referencia) fue graficada en función de los valores

esperados de  $d_i$ . Para el eje Y se condujo un análisis similar. Los valores esperados de  $d_i$  son estimados a partir del conocimiento del espacio entre las líneas provistas por el fabricante de la retícula y el factor de calibración pixel-micrómetro de nuestra cámara CMOS. El factor de calibración de la cámara se obtuvo capturando una imagen de la retícula de calibración con iluminación azul, omitiendo de esta manera la influencia de la ACL. Finalmente, la pendiente ( $k$ ) fue calculada a partir del ajuste lineal de estos datos y nos proveyó una medida del error en posición (en el caso ideal la pendiente debe de ser igual a 1). Para la imagen original (sin corrección de la ACL) obtuvimos los factores  $k_x = 1.0078$  (Figura 3.5b) y  $k_y = 1.0071$  (Figura 3.5d), después de la corrección obtuvimos los factores de  $k_{x-corr} = 1.0009$  (Figura 3.5c) y  $k_{y-corr} = 1.00033$  (Figura 3.5e). Este resultado indica que la magnitud de la ACL alrededor de campo de visión fue reducida a un valor menor de 0.1%.

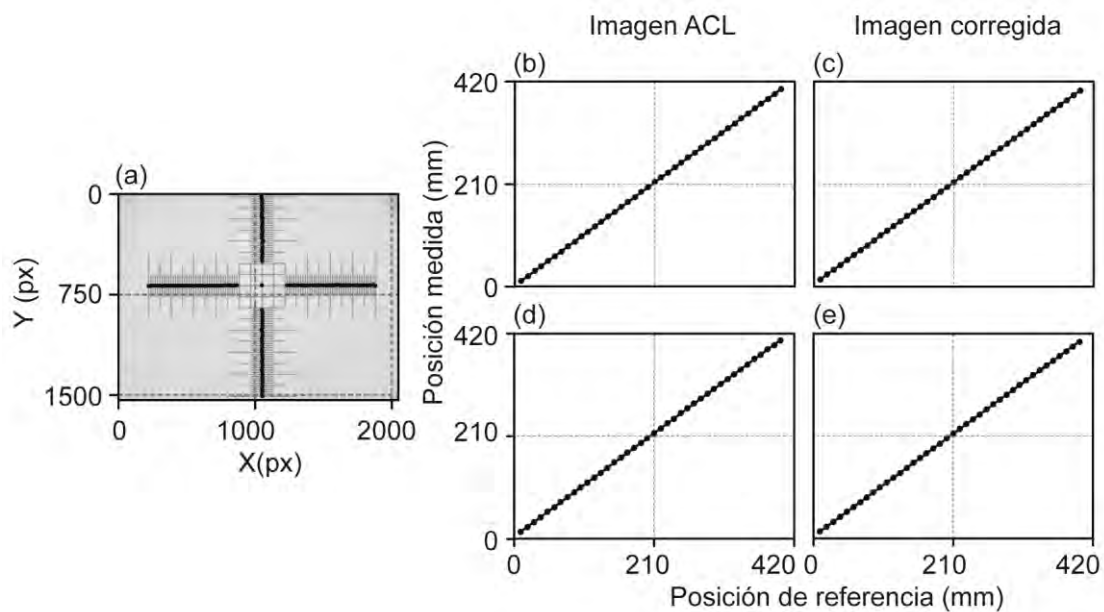


Figura 3.5 Evaluación cuantitativa de la ACL después del procedimiento de corrección. (a) Una rejilla de calibración fue capturada y se determinaron las coordenadas de los centroides ( $X_i$ ,  $Y_i$ ) de las marcas de las líneas de referencia a lo largo del eje X e Y antes y después de la corrección (c)-(e). Las líneas de ajuste (líneas sólidas) de los datos (puntos) nos proporcionaron una medida del error de posición debido a la aberración cromática (Ver texto).

### 3.2.3 Registro fiel de contenido de color

Estudiamos el impacto de nuestro procedimiento de corrección en el contenido de color de las imágenes por medio de histogramas de color, los cuales representan el

número de colores presentes en una imagen. Los histogramas de color son diagramas 3D-cartesianos contruidos a partir de la información de los valores de intensidad de los pixeles de los canales **R**, **G** y **B**, donde a cada canal de color es asignado a uno de los ejes coordenados y el valor del pixel define la posición en el correspondiente eje. La intersección de estos valores crea un punto en el sistema cardinal cuya tonalidad es calculada como una ponderación de las intensidades en los canales **R**, **G** y **B** en ese pixel. Los histogramas de color son usados también en la cuantificación de colores, donde un rango de colores es reducido a un solo valor, comprimiendo el número de colores presentes en una imagen.

Anteriormente, en algunos reportes acerca de la reducción de la ACL en sistemas de captura de imágenes (principalmente cámaras digitales) han sido utilizados los histogramas de color para mostrar que los algoritmos de corrección reducen consistentemente el número de colores presentes en una imagen después de su aplicación [92, 107].

Sin embargo, en la evaluación de los efectos de un procedimiento para extraer la ACL en imágenes sería deseable comparar el contenido de color de una imagen corregida respecto a una imagen de referencia sin ACL. Para abordar este punto, dividimos el campo de visión de la cámara en cinco zonas: una sección central donde el error inducido por la ACL es pequeño (<30% de la magnitud de la desviación máxima) y otras 4 secciones colindantes al área central (véase la Figura 3.6). Se colocó una región de interés de la muestra (*Region of interest* o ROI) en la sección central y se definió como la imagen sin aberración (ROI<sub>ACL-free</sub>), después la muestra fue desplazada a una sección periférica para que la ROI previamente identificada sufriera los efectos de la ACL (ROI<sub>ACL</sub>). En los ejemplos siguientes situamos las ROI en la sección II. Finalmente el procedimiento de remoción de la ACL fue aplicado sobre la ROI<sub>ACL</sub> y su correspondiente histograma de color fue comparado con el de ROI<sub>ACL-free</sub>.

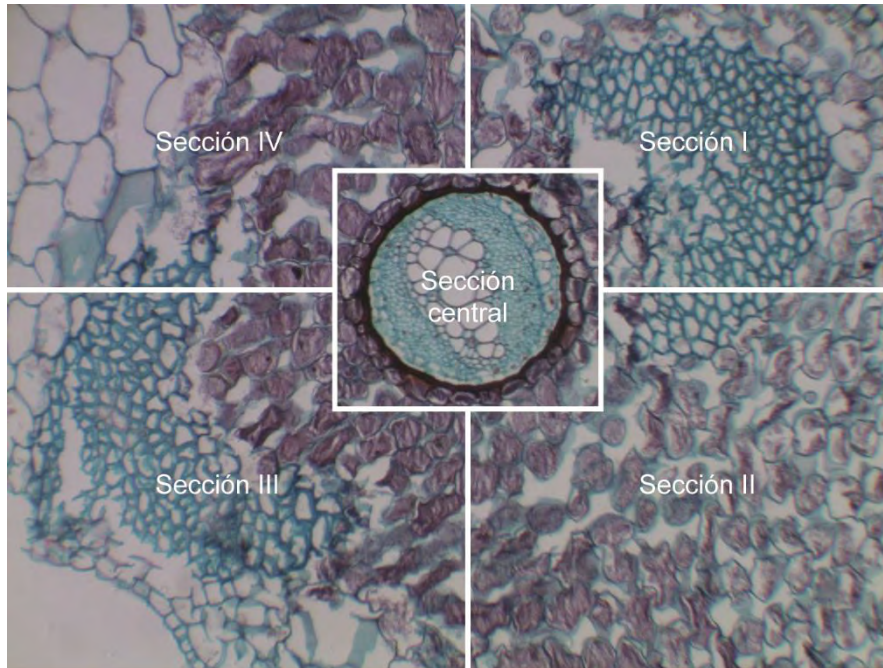


Figura 3.6 Seccionamiento de las imágenes para cuantificar el contenido de color antes y después de la corrección de la ACL con una sección central con ACL mínima. Campo de visión: 1229  $\mu\text{m}$  x 921  $\mu\text{m}$ . La muestra teñida corresponde al tallo de un árbol de tejo joven.

Se usaron muestras biológicas teñidas y un patrón de prueba para evaluar su contenido de color. Los resultados de nuestra metodología se muestran en la Figura 7, donde las columnas 1,2 y 3 (de izquierda a derecha) despliega los ejemplos de las imágenes  $ROI_{ACL-free}$  (Figuras 3.7a, g, m), las  $ROI_{ACL}$  originales (Figuras 3.7b, h, n) y las  $ROI_{ACL}$  corregidas (Figuras 3.7c, i, o) respectivamente. Debajo de cada imagen se muestra su correspondiente histograma de color. A partir de estas imágenes se observa claramente que los histogramas de color tienen una distribución característica en su forma y número de colores presentes cuando provienen de la región central. Estas distribuciones son drásticamente modificadas cuando las ROI son capturadas en la sección II donde se inducen falsos colores en un grado significativo. No obstante, se logra recuperar después de la corrección de la imagen mostrando que las distribuciones vuelven lo más cercano a su forma y tamaño tomando como referencia el histograma de la posición central.



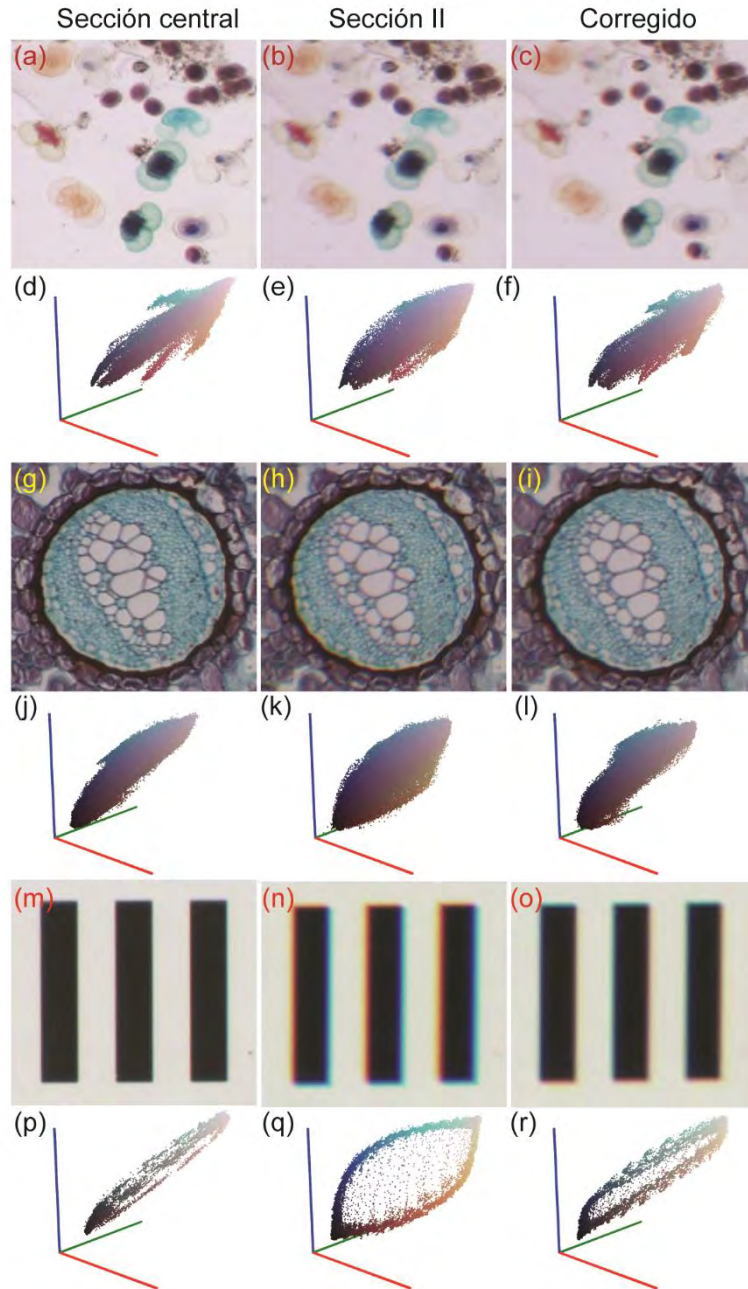


Figura 3.7 Cuantificación del color en imágenes de muestras biológicas de granos de polen (a)-(c), tallos de árbol de tejo (g)-(i) y un patrón USAF-1951 (m)-(o) y sus correspondientes histogramas de color debajo de ellos. La columna de la izquierda (a), (d), (g), (j), (m), (p) muestra las secciones de referencia libre de ACL (correspondiente a la sección central en la Figura 2.6) y sus histogramas de color. La columna del centro (b), (e), (h), (k), (n), (q) muestra las secciones afectados por la ACL (correspondiente a la sección II en la Figura 6) y sus histogramas de color. La columna de la derecha (c), (f), (i), (l), (o), (r) muestra las secciones de la ACL afectado después de la corrección y sus histogramas de color. Campo de visión: (a)-(c) 241 mm x 256 mm (g)-(i) 356 mm x 356 mm, (m)-(o) 146 mm x 146 mm.



### 3.2.4 Incremento en la exactitud en las mediciones de morfología

En esta sección mostramos este efecto mediante el análisis en una imagen de especímenes de granos de polen. Tanto la imagen original (Figura 3.8a) como la imagen corregida (Figura 3.8d) fueron procesadas con el siguiente procedimiento de clasificación: (a) segmentación de color usando la técnica de agrupamiento por K-means [6], (b) aplicación método de detección de umbral a cada imagen resultante, (c) conversión de la escala de grises a escala binaria, (d) reducción de ruido en la imagen y (e) determinación de la redondez de los granos de polen. Para nuestros propósitos, hemos adaptado los códigos preexistentes de MATLAB “Granulometry of snowflakes” y “Detect and measure circular objects in an image”, disponibles en las referencias [108, 109].

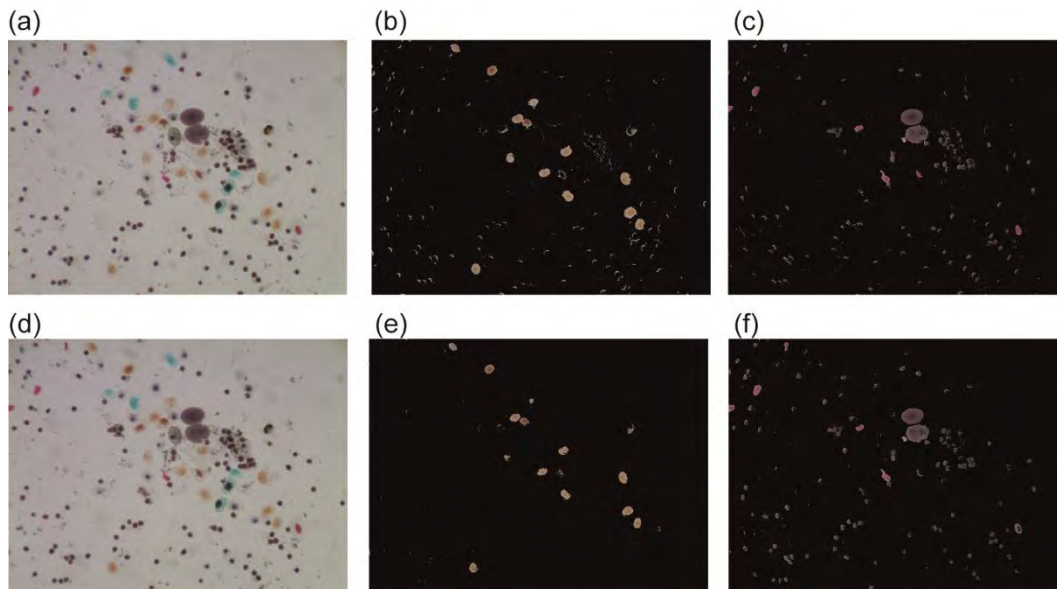


Figura 3.8 Segmentación de color en imágenes de granos de polen por el método de K-means. Fila superior: imagen original (a) y su correspondiente (b) clúster amarillo y (c) clúster rosa oscuro. Los clústeres muestran alto contenido de ruido y erosión en objetos. Fila inferior: (d) imagen corregida y sus correspondientes (e) clúster amarillo y clúster de color rosa oscuro (f). La corrección de la ACL en particular reduce el ruido y la erosión en los objetos. Campo de visión: 1229  $\mu\text{m}$  x 921  $\mu\text{m}$ .

Usamos el algoritmo de K-means para clasificar los granos de polen en 2 conjuntos cuyos miembros fueron subsecuentemente segmentados en un clúster amarillo (Figuras 3.8b, e) y un clúster rosa (Figuras 3.8c, f). En ellas es notorio

observar que después de la segmentación en la imagen original se produce ruido (Figura 3.8b) y erosión de los objetos (Figura 3.8c). En contraste, en la imagen corregida después de la segmentación se reducen considerablemente los efectos negativos y la clasificación es mejorada (Figuras 3.8e, f).

La mejora en la determinación de formas de objetos en imágenes puede ser cuantificada mediante la evaluación del factor de redondez (*circumference factor* o *cf*) de los granos de polen y son calculados con:  $cf = 4\pi A/P^2$ , donde  $A$  es el área del objeto y  $P$  es su perímetro.

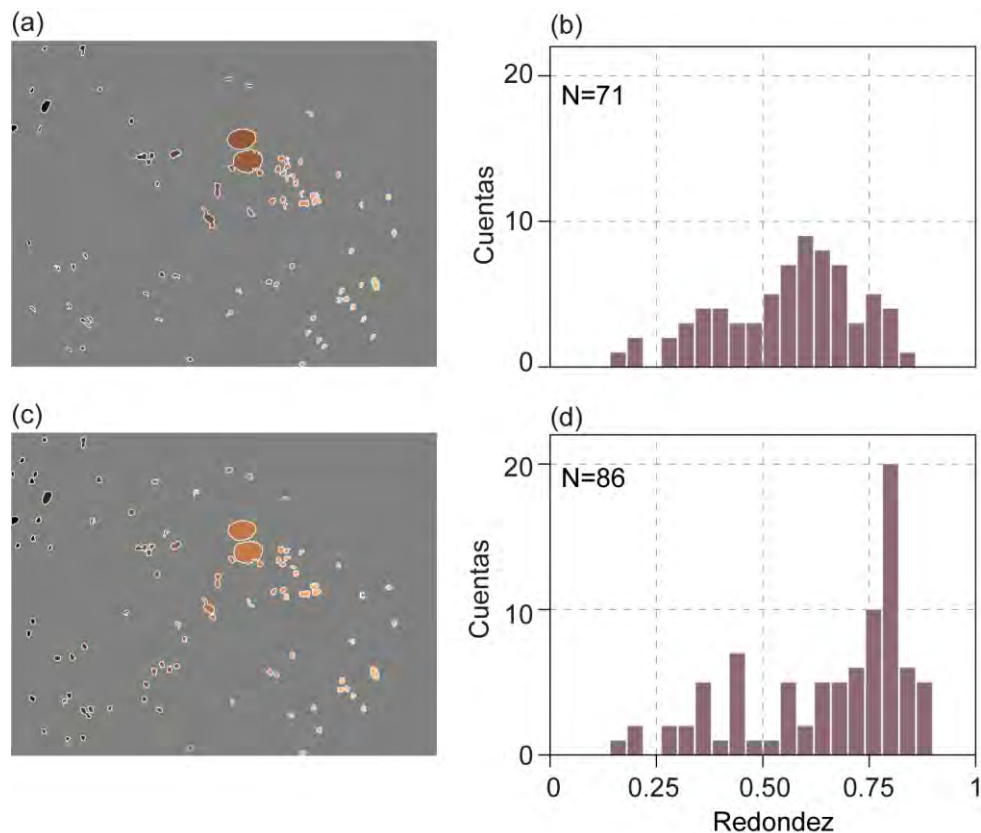


Figura 3.9 Análisis cuantitativo de los resultados de segmentación basada en el color. El clúster rosa oscuro y (b) su correspondiente histograma de los valores de redondez. (c) El clúster rosado oscuro después de la corrección de la ACL y (d) su correspondiente histograma de los valores de factor de redondez. Campo de visión: (a), (c) 1229  $\mu\text{m}$  x 921  $\mu\text{m}$ .

Este factor tiene valores en el rango de 0 (redondez nula) a 1 (redondez alta) [110]. Para los granos de polen se esperaba un factor  $cf > 0.6$  [111, 112]. El análisis del clúster rosa en nuestra muestra de polen resultó en un valor de  $cf = 0.55 \pm 0.16$  (promedio  $\pm$  desviación estándar, moda = 0.62) para la imagen original (véase la

Figuras 3.9a, b), mientras que en la imagen corregida el valor fue  $cf = 0.65 \pm 0.20$  (promedio  $\pm$  desviación estándar, moda = 0.82) (véase la Figura 3.9c, d). Por lo tanto, la clasificación de objetos por la redondez es mejorada usando nuestro método de corrección de ACL.

Es importante recalcar que el desarrollo del método de corrección en conjunto con la innovación realizada al microscopio de bajo costo y cuyo uso cotidiano es la simple inspección visual de muestras, incrementara su confiabilidad para realizar estudios de microscopía. Tanto el método como la adecuación multiplexor óptico pueden replicarse en cualquier tipo de microscopio de campo claro, lo cual es importante cuando se tienen recursos limitados para la adquisición de equipos comerciales de alto desempeño cuyo costo supera hasta 10 veces el costo de un microscopio de grado estudiantil.

# Capítulo 4

## Conclusiones

A través del desarrollo del documento se ha expuesto la importancia del análisis de imágenes para estudios biológicos, propiedades de materiales y diagnóstico de enfermedades. Aun cuando el enfoque es sobre microscopía óptica, estos métodos y e innovaciones que hemos desarrollado se pueden proyectar en otras áreas como la robótica y los sistemas de automatización donde la visión artificial han tenido una importante repercusión.

Hablando de manera puntual, resaltaremos los objetivos cumplidos en este trabajo doctoral.

En relación al trabajo sobre el desarrollo de sistema de barrido laser, al revisar el estado de arte sobre este tópico observamos que el enfoque principal para el diseño es el utilizar componentes dedicados para este fin, cuya precisión está definida por los fabricantes o por la naturaleza del componente utilizado, estableciendo una relación directa entre el costo y la precisión del sistema, es decir a mayor costo mayor precisión. En otros casos la corrección de error se ha realizado estimando el error existente en el sistema para luego compensarlo usando sistemas de control electrónico y/o software de control. Lo anterior implica que cada sistema que se use para realizar el barrido láser se someta una etapa previa de calibración, cuyos parámetros obtenidos no se pueden utilizar con otros sistemas aun cuando su topología es similar.

En ambos casos no se consideran los efectos de la temperatura tanto en el sistema de control electrónico como los elementos mecánicos, las vibraciones mecánicas y el desgaste de tales componentes.

En nuestro trabajo logramos desarrollar un sistema de barrido láser de alta precisión con espejos galvanométricos de bajo rendimiento. La adición del control electrónico tipo PID con un sensor PSD como sistema de retroalimentación fue el punto clave para lograr reducir el error en posición, como lo muestran los mapas

obtenidos en la etapa de caracterización. Este punto es relevante en la aplicación propuesta ya que el correcto posicionamiento de la proyección del haz en la muestra define hasta cierto grado la nitidez de la imagen.

Por otro lado, aunque el tiempo de respuesta del módulo PID es de  $4.6 \mu\text{s}$ , el tiempo de respuesta del sistema de barrido completo es relativamente lento  $t \approx 50 \text{ ms}$  en comparación a los que se presentan en el estado del arte de  $\approx 120 \mu\text{s}$ . Este retraso adicional en la respuesta se la atribuimos al tamaño y peso de los espejos galvanométricos utilizados en el sistema de barrido cuya inercia rotacional dificulta al control PID la restauración de la posición del haz en tiempos menores a  $50 \text{ ms}$ . Queda entonces como perspectiva de este trabajo mejorar el tiempo de respuesta del sistema para lo cual se ha considerado utilizar micro espejos cuyo tamaño y tiempos de respuesta pueden resolver los problemas mencionados.

Finalmente consideramos que los efectos negativos de la temperatura, las vibraciones mecánicas y el desgaste de los componentes, pueden reducirse significativamente ya que el PID obliga al sistema a ubicar la posición deseada independientemente de las variables mencionadas.

En el área de microscopía óptica, como ya se ha mencionado previamente en este documento, los esfuerzos para reducir la aberración cromática se ha concentrado principalmente en la técnica de microscopía de fluorescencia. Los métodos desarrollados para la remoción de la ACL han probado ser efectivos como lo demuestran los distintos experimentos diseñados para comprobarlo. Sin embargo estos métodos los han limitado hacia la microscopía de fluorescencia donde las condiciones propias del equipo y la técnica de iluminación facilitan la calibración del sistema así como su corrección y la validación de los mismos. Lo anterior dificulta que estos métodos puedan exportarse a otras técnicas de iluminación como la microscopía de campo claro.

En relación de nuestro trabajo para la corrección de la aberración cromática en imágenes de microscopía de campo claro, nuestros resultados sugieren que el método que reportamos para reducir los efectos negativos de la ACL en imágenes es útil para reducirla significativamente. En trabajos previamente reportados para

la calibración y corrección de la ACL usando la técnica de *image warping* se han propuesto modelos de transformación polinómicas que han resultado efectivos para remover la ACL de acuerdo a la aplicación y el tipo de sistema óptico evaluado, mejorando aspectos visuales como la nitidez de las imágenes. En nuestro caso, los datos que obtuvimos muestran que el modelo de transformación para calibrar la ACL y su posterior corrección es lineal, logrando resultados similares.

De igual manera, la mayoría de los trabajos previos revisan la efectividad del método de corrección comparando la nitidez visual entre las imágenes originales y las corregidas, complementándolo con el análisis del perfil de intensidades y/o la distribución en la posición de los píxeles en histogramas de color. Logramos extender estos estudios ya que mostramos el efecto localizado de la corrección y a su vez presentamos el efecto total en el campo visual de la imagen, lo que proporciona una descripción más completa del efecto de la ACL y su corrección. También logramos desarrollar una prueba cuantitativa real al utilizar un patrón milimétrico con una resolución de 0.01 mm y determinar la tendencia del error en la cuantificación de variables de posición, como la distancia entre objetos de las imágenes.

En el caso del uso de histogramas de color para evaluar la ACL proponemos un nuevo modelo de referencia que, si bien no corresponde a una imagen libre de aberración cromática, posee un contenido de color que se acerca al modelo ideal, por lo que el análisis comparativo de los histogramas de color es más confiable. En la práctica real del análisis asistido por computadora los colores falsos producto de la ACL alteran el proceso de segmentación por color provocando errores al clasificar los conjuntos o grupos de interés e inducir ruido en los mismos. Al aplicar nuestro método de corrección a la imagen de una muestra de granos de polen mixtos y con tinciones diferentes los errores fueron disminuidos significativamente recuperando aproximadamente la morfología real de los granos (redondez) y a su vez logrando una mejor clasificación de los conjuntos por color.

Otros aspectos positivos de nuestro método es su fácil implementación y de bajo costo. De igual manera, el programa de corrección es relativamente corto

(aproximadamente 10 líneas de código), por lo que su portabilidad a distintas plataformas de programación es sencilla. Considerando que los sistemas ópticos de microscopía tienen una respuesta similar respecto al modelo de transformación de esta propuesta, es posible que este modelo pueda replicarse en la mayoría de los sistemas de microscopía de campo claro.

También se resalta en este trabajo que la implementación del sistema del multiplexor óptico en el microscopio abre la posibilidad de que se realicen estudios de microscopía donde el factor predominante en el análisis sea la iluminación con longitudes de onda específicas. Además, se transformó un sistema de microscopía que tradicionalmente se utiliza sólo para visualizar muestras, en un sistema analítico y cuantitativo de microscopía.

Como parte de una extensión de este trabajo consideramos la compensación de la aberración cromática axial. Además sería deseable estudiar los efectos de la deriva mecánica de la platina del microscopio, su alineación respecto al plano de la muestra (*tilt*), y los efectos ambientales como la temperatura.

## Referencias

1. B. R. Masters, "Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging, Second Edition," *J. Biomed. Opt.* **18**, 029901 (2013).
2. J. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy* (Springer, 2010).
3. C. Bayles, *Light and Video Microscopy* (American Institute of Biological Sciences, 2010).
4. X. Long, W. L. Cleveland, and Y. L. Yao, "Multiclass cell detection in bright field images of cell mixtures with ECOC probability estimation," *Image and Vision Comput.* **26**, 578-591 (2008).
5. E. Meijering, O. Dzyubachyk, and I. Smal, "Methods for cell and particle tracking," *Methods Enzymol.* **504**, 183-200 (2012).
6. N. A. M. Isa, "Automated edge detection technique for Pap smear images using moving K-means clustering and modified seed based region growing algorithm," *IJCIM* **13**, 45-58 (2005).
7. A. Bahnon, C. Athanassiou, D. Koebler, L. Qian, T. Shun, D. Shields, H. Yu, H. Wang, J. Goff, T. Cheng, R. Houck, and L. Cowser, "Automated measurement of cell motility and proliferation," *BMC Cell Biol.* **6**, 19 (2005).
8. T. A. Nenasheva, T. Carter, and G. I. Mashanov, "Automatic tracking of individual migrating cells using low-magnification dark-field microscopy," *J. Microsc.* **246**, 83-88 (2012).
9. A. I. Abdel-Fattah, M. S. El-Genk, and P. W. Reimus, "On visualization of sub-micron particles with dark-field light microscopy," *J. Colloid. Interface Sci.* **246**, 410-412 (2002).
10. K. K. Ghosh, L. D. Burns, E. D. Cocker, A. Nimmerjahn, Y. Ziv, A. E. Gamal, and M. J. Schnitzer, "Miniaturized integration of a fluorescence microscope," *Nat. Methods* **8**, 871-878 (2011).
11. N. S. Claxton, T. J. Fellers, and M. W. Davidson, "Microscopy, Confocal," in *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*(John Wiley & Sons, 2006).



12. L. Lacerda, G. Pastorin, D. Gathercole, J. Buddle, M. Prato, A. Bianco, and K. Kostarelos, "Intracellular Trafficking of Carbon Nanotubes by Confocal Laser Scanning Microscopy," *Adv. Mater.* **19**, 1480-1484 (2007).
13. M. Peyre, E. Clermont-Taranchon, A. Stemmer-Rachamimov, and M. Kalamarides, "Miniaturized handheld confocal microscopy identifies focal brain invasion in a mouse model of aggressive meningioma," *Brain Pathol.* **23**, 371-377 (2013).
14. M. Capek, P. Bruza, J. Janacek, P. Karen, L. Kubinova, and R. Vagnerova, "Volume reconstruction of large tissue specimens from serial physical sections using confocal microscopy and correction of cutting deformations by elastic registration," *Microsc. Res. Tech.* **72**, 110-119 (2009).
15. C. Longo, A. Casari, F. Beretti, A. M. Cesinaro, and G. Pellacani, "Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy," *J. Am. Acad. Dermatol.* **68**, 73-82 (2013).
16. Y. Wang, S. Bish, J. W. Tunnell, and X. Zhang, "MEMS scanner based handheld fluorescence hyperspectral imaging system," *Sensors and Actuat. A-Phys.* **188**, 450-455 (2012).
17. N. Yao, and Z. L. Wang, *Handbook of microscopy for nanotechnology* (Springer, 2005).
18. M. R. Youmin Wang, H. Stan McGuff, Gauri Bhave, Bin Yang, Ting Shen and Xiaojing Zhang, "Portable oral cancer detection using a miniature confocal imaging probe with a large field of view," *J. Micromech. Microeng.* **22**, 065001 (2012).
19. H. Irshad, A. Veillard, L. Roux, and D. Racoceanu, "Methods for nuclei detection, segmentation, and classification in digital histopathology: a review-current status and future potential," *IEEE Rev. Biomed. Eng.* **7**, 97-114 (2014).
20. E. Hecht, *Optics* (Addison-Wesley 2001).
21. J. T. Korneliussen, and K. Hirakawa, "Camera processing with chromatic aberration," *IEEE Trans. Image Process.* **23**, 4539-4552 (2014).

22. H. H. Hopkins, and P. M. Barham, "The influence of the condenser on microscopic resolution," *P. Phys. Soc. Lond. B* **63**, 737 (1950).
23. G. Seward, *Optical design of microscopes* (SPIE, 2010).
24. T. Rochow, and P. Tucker, "Definitions, Attributes of Visibility, and General Principles," in *Introduction to Microscopy by Means of Light, Electrons, X Rays, or Acoustics*(Springer, 1994), pp. 23-36.
25. S. Inoué, and R. J. Walter, *Video microscopy* (Plenum Press New York, 1986).
26. H. E. Keller, "Objective Lenses for Confocal Microscopy," in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, J. B. Pawley, ed. (Springer, 2006), pp. 145-161.
27. T. S. McKechnie, "The Effect of Condenser Obstruction on the Two-point Resolution of a Microscope," *Opt. Acta.* **19**, 729-737 (1972).
28. D. Grasseschi, F. S. Lima, M. Nakamura, and H. E. Toma, "Hyperspectral dark-field microscopy of gold nanodisks," *Micron* **69**, 15-20 (2015).
29. N. M. Dragomir, X. M. Goh, C. L. Curl, L. M. Delbridge, and A. Roberts, "Quantitative polarized phase microscopy for birefringence imaging," *Opt. Express* **15**, 17690-17698 (2007).
30. D. Goldstein, and D. H. Goldstein, *Polarized Light, revised and expanded* (CRC Press, 2011).
31. A. Changoor, N. Tran-Khanh, S. Methot, M. Garon, M. B. Hurtig, M. S. Shive, and M. D. Buschmann, "A polarized light microscopy method for accurate and reliable grading of collagen organization in cartilage repair," *Osteoarthr. Cartilage* **19**, 126-135 (2011).
32. E. Rodriguez-Leon, R. Iniguez-Palomares, E. Urrutia-Banuelos, R. Herrera-Urbina, J. Tanori, and A. Maldonado, "Self-alignment of silver nanoparticles in highly ordered 2D arrays," *Nanoscale Res. Lett.* **10**, 101 (2015).
33. J. R. Craig, D. J. Vaughan, and R. D. Hagni, *Ore microscopy and ore petrography* (Wiley New York, 1981).

34. C. Menzel, C. Helgert, C. Rockstuhl, E. B. Kley, A. Tünnermann, T. Pertsch, and F. Lederer, "Asymmetric transmission of linearly polarized light at optical metamaterials," *Phys. Rev. Lett.* **104**, 253902 (2010).
35. R. D. Allen, "New observations on cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy," *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**, 265-290 (1985).
36. S. Huh, D. F. Ker, R. Bise, M. Chen, and T. Kanade, "Automated mitosis detection of stem cell populations in phase-contrast microscopy images," *IEEE Trans. Med. Imaging* **30**, 586-596 (2011).
37. L. Kang, E. D. Miller, L. E. Weiss, P. G. Campbell, and T. Kanade, "Online Tracking of Migrating and Proliferating Cells Imaged with Phase-Contrast Microscopy," in *Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshop*(IEEE2006), p. 65.
38. P. A. Santi, "Light sheet fluorescence microscopy: a review," *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 129-138 (2011).
39. M. Minsky, "Memoir on inventing the confocal scanning microscope," *Scanning* **10**, 128-138 (1988).
40. P. Ferrand, M. Pianta, A. Kress, A. Aillaud, H. Rigneault, and D. Marguet, "A versatile dual spot laser scanning confocal microscopy system for advanced fluorescence correlation spectroscopy analysis in living cell," *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 083702 (2009).
41. K. S. Wells, D. Sandison, J. Strickler, and W. Webb, "Quantitative Fluorescence Imaging with Laser Scanning Confocal Microscopy," in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J. Pawley, ed. (Springer US, 1990), pp. 27-39.
42. E. Gratton, and M. J. VandeVen, "Laser sources for confocal microscopy," in *Handbook of biological confocal microscopy*(Springer, 1995), pp. 53-67.
43. V. N. Mahajan, and V. N. Mahajan, *Aberration theory made simple* (SPIE optical engineering press Bellingham, 1991).

44. C.-S. Chiang, K.-N. Huang, Y.-C. Li, and C.-H. Luo, "Design of a hand-held automatic focus digital microscope by using CMOS image sensor," *Measurement* **70**, 88-99 (2015).
45. D. N. Fuller, A. L. Kellner, and J. H. Price, "Exploiting chromatic aberration for image-based microscope autofocus," *Appl. Opt.* **50**, 4967 (2011).
46. R. Ramanath, W. E. Snyder, G. L. Bilbro, and W. A. Sander, "Demosaicking methods for Bayer color arrays," *J. Electron. Imagin.* **11**, 306 (2002).
47. I. L. Weatherall, and B. D. Coombs, "Skin color measurements in terms of CIELAB color space values," *J. Invest. Dermatol.* **99**, 468-473 (1992).
48. C. Connolly, and T. Fleiss, "A study of efficiency and accuracy in the transformation from RGB to CIELAB color space," *IEEE Trans. Image Process.* **6**, 1046-1048 (1997).
49. K. León, D. Mery, F. Pedreschi, and J. León, "Color measurement in L\*a\*b\* units from RGB digital images," *Food Res. Int.* **39**, 1084-1091 (2006).
50. "Iluminante estándar D65."
51. R. C. Gonzalez, and R. E. Woods, "Digital image processing," (Prentice Hall New Jersey, 2002).
52. P. Milanfar, "A Tour of Modern Image Filtering: New Insights and Methods, Both Practical and Theoretical," *IEEE Signal Proc. Mag.* **30**, 106-128 (2013).
53. K. Chu, P. J. McMillan, Z. J. Smith, J. Yin, J. Atkins, P. Goodwin, S. Wachsmann-Hogiu, and S. Lane, "Image reconstruction for structured-illumination microscopy with low signal level," *Opt. Express* **22**, 8687-8702 (2014).
54. J. MacQueen, "Some methods for classification and analysis of multivariate observations," in *Proceedings of 5th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*(University of California Press 1967), pp. 281-297.
55. J. M. Peña, J. A. Lozano, and P. Larrañaga, "An empirical comparison of four initialization methods for the K-Means algorithm," *Pattern Recogn. Lett.* **20**, 1027-1040 (1999).

56. A. C. L. Hung, H. Y. H. Lai, T.-W. Lin, S.-G. Fu, and M. S. C. Lu, "An electrostatically driven 2D micro-scanning mirror with capacitive sensing for projection display," *Sensors and Actuators A: Physical* **222**, 122-129 (2015).
57. G. F. Marshall, and G. E. Stutz, *Handbook of optical and laser scanning* (CRC Press, 2011).
58. T. Zhang, P. Godara, E. R. Blanco, R. L. Griffin, X. Wang, C. A. Curcio, and Y. Zhang, "Variability in Human Cone Topography Assessed by Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy," *Am. J. Ophthalmol.* **160**, 290-300.e291 (2015).
59. C. H. Kau, S. Richmond, A. I. Zhurov, J. Knox, I. Chestnutt, F. Hartles, and R. Playle, "Reliability of measuring facial morphology with a 3-dimensional laser scanning system," *Am. J. Orthod. Dentofac.* **128**, 424-430 (2005).
60. M. Kiang, x, Hsiung, O. Solgaard, R. S. Muller, and K. Y. Lau, "Surface-micromachined electrostatic-comb driven scanning micromirrors for barcode scanners," in *In Proceedings of Ninth International Workshop on Micro Electromechanical Systems*(1996), pp. 192-197.
61. A. Wehr, and U. Lohr, "Airborne laser scanning—an introduction and overview," *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens.* **54**, 68-82 (1999).
62. J. Jonkman, and C. M. Brown, "Any Way You Slice It—A Comparison of Confocal Microscopy Techniques," *J. Biomol. Tech.* **26**, 54-65 (2015).
63. C. L. Arrasmith, D. L. Dickensheets, and A. Mahadevan-Jansen, "MEMS-based handheld confocal microscope for in-vivo skin imaging," *Opt. Express* **18**, 3805-3819 (2010).
64. W. Piyawattanametha, J. Liu, M. J. Mandella, H. Ra, L. K. Wong, P. Hsiung, T. D. Wang, G. S. Kino, and O. Solgaard, "MEMS Based Dual-axes Confocal Reflectance Handheld Microscope for in vivo Imaging," in *Optical MEMS and Their Applications Conference*(IEEE2006), pp. 164-165.
65. T. Dabbs, and M. Glass, "Fiber-optic confocal microscope: FOCON," *Appl. Opt.* **31**, 3030-3035 (1992).

66. H.-J. Shin, M. C. Pierce, D. Lee, H. Ra, O. Solgaard, and R. Richards-Kortum, "Fiber-optic confocal microscope using a MEMS scanner and miniature objective lens," *Opt. Express* **15**, 9113 (2007).
67. A. R. Carter, G. M. King, T. A. Ulrich, W. Halsey, D. Alchenberger, and T. T. Perkins, "Stabilization of an optical microscope to 0.1 nm in three dimensions," *Applied Optics* **46**, 421-427 (2007).
68. C. Bechtel, J. Knobbe, H. Gröger, and H. Lakner, "Large field of view MEMS-based confocal laser scanning microscope for fluorescence imaging," *Optik* **125**, 876-882 (2014).
69. R. W. Cole, and J. N. Turner, "Light-Emitting Diodes Are Better Illumination Sources for Biological Microscopy than Conventional Sources," *Microsc. Microanal.* **14**, 243-250 (2008).
70. Z. Kam, M. O. Jones, H. Chen, D. A. Agard, and J. W. Sedat, "Design and construction of an optimal illumination system for quantitative wide-field multi-dimensional microscopy," *Bioimaging* **1**, 71-81 (1993).
71. B. Hohman, "LED light source: major advance in fluorescence microscopy," *Biomed. Instrum. Technol.* **41**, 461-464 (2007).
72. V. Bormuth, J. Howard, and E. Schaffer, "LED illumination for video-enhanced DIC imaging of single microtubules," *J. Microsc.* **226**, 1-5 (2007).
73. X. He, Z. Xiao, and S. He, "A design of LED adaptive dimming lighting system based on incremental PID controller," (SPIE, 2010), p. 78520W.
74. T. P. Meyrath, "An Analog Current Controller Design for Laser Diodes," [http://atomoptics.uoregon.edu/unilaser/unibody\\_files/peripherals/protection\\_circuit/meyrath\\_03.pdf](http://atomoptics.uoregon.edu/unilaser/unibody_files/peripherals/protection_circuit/meyrath_03.pdf).
75. A. Kiam Heong, G. Chong, and L. Yun, "PID control system analysis, design, and technology," *IEEE T. Contr. Syst T.* **13**, 559-576 (2005).
76. V. Michal, Pre, x, C. mont, G. Pillionet, and N. Abouchi, "Single active element PID controllers," in *Radioelektronika*(IEEE2010), pp. 1-4.

77. K. Ogata, *Ingeniería de control moderna* (Pearson Educación, 2003).
78. R. C. Dorf, and R. H. Bishop, "Modern control systems," (1998).
79. J. Hrabina, J. Lazar, M. Hola, and O. Cip, "Frequency noise properties of lasers for interferometry in nanometrology," *Sensors (Basel)* **13**, 2206-2219 (2013).
80. W. Brezna, and J. Smoliner, "Spectrally resolved confocal microscopy for laser mode imaging and beam characteristic investigations," *Appl. Phys. Lett.* **95**, 201118 (2009).
81. S. A. Self, "Focusing of spherical Gaussian beams," *Appl. Opt.* **22**, 658-661 (1983).
82. H. Luo, W. Hu, Z. Ren, W. Shu, and F. Li, "Focusing and phase compensation of paraxial beams by a left-handed material slab," *Opt. Commun.* **266**, 327-331 (2006).
83. J. Zhou, H. Luo, S. Wen, and Y. Zeng, "ABCD matrix formalism for propagation of Gaussian beam through left-handed material slab system," *Opt. Commun.* **282**, 2670-2675 (2009).
84. Y. Suzuki, and A. Tachibana, "Measurement of the microm sized radius of Gaussian laser beam using the scanning knife-edge," *Appl. Opt.* **14**, 2809-2810 (1975).
85. M. A. de Araújo, R. Silva, E. de Lima, D. P. Pereira, and P. C. de Oliveira, "Measurement of Gaussian laser beam radius using the knife-edge technique: improvement on data analysis," *Appl. Opt.* **48**, 393 (2009).
86. W. Plass, R. Maestle, K. Wittig, A. Voss, and A. Giesen, "High-resolution knife-edge laser beam profiling," *Opt. Commun.* **134**, 21-24 (1997).
87. M. Born, and E. Wolf, *Principles of optics, Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light* (Cambridge University Press, 2000).

88. R. G. Willson, and S. A. Shafer, "Active lens control for high precision computer imaging," in *Proceedings of IEEE International Conference on Robotics and Automation*(IEEE1991), pp. 2063-2070.
89. C. L. Novak, S. A. Shafer, and R. G. Willson, "Obtaining accurate color images for machine-vision research," (SPIE, 1990), pp. 54-68.
90. T. E. Boult, and G. Wolberg, "Correcting chromatic aberrations using image warping," in *Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*(IEEE1992), pp. 684-687.
91. C. A. Glasbey, and K. V. Mardia, "A review of image-warping methods," *J. Appl. Stat.* **25**, 155-171 (1998).
92. V. Rudakova, and P. Monasse, "Precise correction of lateral chromatic aberration in images," in *Image and Video Technology*(Springer, 2013), pp. 12-22.
93. C. Soon-Wook, K. Byoung-Kwang, and S. Woo-Jin, "Detecting and eliminating chromatic aberration in digital images," in *Proceedings of IEEE International Conference on Image Processing*(IEEE2009), pp. 3905-3908.
94. C. J. Schuler, M. Hirsch, S. Harmeling, and B. Scholkopf, "Non-stationary correction of optical aberrations," in *Proceedings of IEEE International Conference on Computer Vision*(IEEE2011), pp. 659-666.
95. H. Kang, "Partial differential equation–based approach for removal of chromatic aberration with local characteristics," *J. Electron. Imagin.* **19**, 033016 (2010).
96. S. Fenz, H. Mathée, G. Kreth, D. Baddeley, Y. Weiland, J. Schwarz-Finstlerle, C. G. Cremer, and U. J. Birk, "Two-color intranuclear distance measurements of gene regions in human lymphocytes," (SPIE, 2007), p. 663002.
97. N. S. White, R. J. Errington, M. D. Fricker, and J. L. Wood, "Aberration control in quantitative imaging of botanical specimens by multidimensional fluorescence microscopy," *J. Microsc.* **181**, 99-116 (1996).



98. E. M. M. Manders, "Chromatic shift in multicolour confocal microscopy," *J. Microsc.* **185**, 321-328 (1997).
99. M. Kozubek, and P. Matula, "An efficient algorithm for measurement and correction of chromatic aberrations in fluorescence microscopy," *J. Microsc.* **200**, 206-217 (2000).
100. S. Tucker, W. T. Cathey, and E. Dowski, Jr., "Extended depth of field and aberration control for inexpensive digital microscope systems," *Opt. Express* **4**, 467-474 (1999).
101. M. P. De Sá-otero, A. González, M. Rodríguez-Damián, and E. Cernadas, "Computer-aided identification of allergenic species of Urticaceae pollen," *Grana* **43**, 224-230 (2004).
102. N. R. Nguyen, M. Donalson-Matasci, and M. C. Shin, "Improving pollen classification with less training effort," in *Proceedings of IEEE Workshop on Applications of Computer Vision*(IEEE2013), pp. 421-426.
103. D. F. Albeanu, E. Soucy, T. F. Sato, M. Meister, and V. N. Murthy, "LED arrays as cost effective and efficient light sources for widefield microscopy," *PLoS One* **3**, e2146 (2008).
104. R. Lukac, and K. N. Plataniotis, "Normalized color-ratio modeling for CFA interpolation," *IEEE T. Consum. Electr.* **50**, 737-745 (2004).
105. M. Singh, and T. Singh, "Joint chromatic aberration correction and demosaicking," (SPIE, 2012), p. 82990D.
106. J. Parker, R. V. Kenyon, and D. E. Troxel, "Comparison of interpolating methods for image resampling," *IEEE Trans. Med. Imaging.* **2**, 31-39 (1983).
107. J. Mallon, and P. F. Whelan, "Calibration and removal of lateral chromatic aberration in images," *Pattern Recogn. Lett.* **28**, 125-135 (2007).
108. "Detect and measure circular objects in an image,"  
<http://www.mathworks.com/help/images/examples/detect-and-measure-circular-objects-in-an-image.html>.

109. "Granulometry of snowflakes,"  
<http://www.mathworks.com/help/images/examples/granulometry-of-snowflakes.html>.
110. R. S. Montero, and E. Bribiesca, "State of the art of compactness and circularity measures," *International Mathematical Forum* **4**, 1305-1335.
111. K. A. Holt, and M. S. Bebbington, "Separating morphologically similar pollen types using basic shape features from digital images: A preliminary study(1.)," *Appl. Plant. Sci.* **2**, 1400032 (2014).
112. S. J. Mudd, and H. S. Arathi, "Image analysis protocol for detecting and counting viable and inviable pollen grains," *J. Plant Studies* **1**, 158-167 (2012).