

**IMÁGENES DE SPECKLE DINÁMICO, DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN PARA LA
ESTIMACIÓN DE BIOACTIVIDAD, PARTE 1**

MARÍA ALEJANDRA VALDIVIESO GÓMEZ



**DEPARTAMENTO DE FÍSICA Y GEOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA, COLOMBIA
2022**

**IMÁGENES DE SPECKLE DINÁMICO, DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN PARA LA
ESTIMACIÓN DE BIOACTIVIDAD, PARTE 1**

MARÍA ALEJANDRA VALDIVIESO GÓMEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Físico

Director

JORGE ENRIQUE RUEDA PARADA

Doctor en Ciencias Naturales-Física



**GRUPO DE ÓPTICA MODERNA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA Y GEOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA, COLOMBIA
2022**

A mi amada mami, María Eugenia.

Agradecimientos

A mi director, el Dr. Jorge Rueda, por proponerme este tema tan exigente y por confiar en que lo podía desarrollar, así como también por su paciencia cuando yo perdía la motivación. A él y a todos los docentes de Física por sus enseñanzas y cariño, gracias.

A mi amada *madre* por siempre creer en mí, apoyarme y escucharme durante toda la carrera y tratar de comprenderme cuando ni siquiera yo podía hacerlo. A ella le debo además de la vida, éste, mi mayor logro hasta el momento.

Mi pequeña familia, *mi mamá y mi hermano*, el motor de mi vida, el impulso para alcanzar mis metas y la promesa de que nunca estaré completamente sola. Los amo, Gracias.

A mis amigas, *Linda, Nini y Blanca*, quienes lucharon conmigo en este largo proceso, con quienes compartí horas infinitas de estudio y también de risas, quienes me ayudaron a levantar cuando no podía sola y me motivaron cuando pensé que no lo iba a lograr. Eternamente, ¡Gracias!.

A todas esas personas que contribuyeron en mi desarrollo como profesional y personal aun sin ser mi familia.

A los compañeros y colegas que conocí en el transcurso de estos años y que me acompañaron y apoyaron en este proceso.

Y, por último, a *mi padre* que, aunque no pudo estar a mi lado, sé que entre las estrellas, está orgulloso de que a pesar de todo, pude lograrlo.

IMÁGENES DE SPECKLE DINÁMICO, DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN PARA LA ESTIMACIÓN DE BIOACTIVIDAD, PARTE 1

María Alejandra Valdivieso Gómez

Estudiante de Física

Jorge Enrique Rueda Parada

Doctor en Ciencias Naturales- Física

Director del trabajo

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de diseño, construcción y puesta en funcionamiento de un sistema óptico-digital fundamentado en la técnica de biospeckle; esta implementación fue aplicada en la estimación del tiempo medio de movilidad de dispersores biológicos sometidos a deshidratación ambiente y bajo temperatura controlada. Las pruebas se hicieron con muestras de seis tipos de tejido vegetal. Se desarrolló una herramienta software que permite la captura de una secuencia de imágenes de speckle, el tratamiento digital de las mismas, y el cálculo de descriptores estadísticos que permiten determinar el tiempo medio de deshidratación del tejido en un intervalo de tiempo de secado definido por el usuario. La herramienta software hace el cálculo de los descriptores estadísticos: matriz de historial de tiempo del patrón speckle, matriz de coocurrencia, momento de inercia, coeficiente de correlación, segundo momento angular, homogeneidad e histograma.

Palabras clave: Speckle, Biospeckle, Descriptores estadísticos, THSP, Comatriz, Histograma.

Contenido

CAPITULO I.....	13
1.1. Introducción.....	13
1.2. Antecedentes y justificación.....	15
1.3. Planteamiento del problema	22
1.4. Objetivos.....	22
1.4.1. General.....	22
1.4.2. Específicos	22
CAPITULO II.....	23
2.1. Speckle.....	23
2.1.1. Tipos de speckle.....	26
2.1.1.1. Speckle objetivo.....	26
2.2. Análisis del speckle	31
2.2.1. Estadísticas espaciales de primer orden.....	32
2.2.2. Estadística temporal de primer orden.	35
2.2.3. Estadística de segundo orden.	37
2.2.4. Conexión entre estadísticas espaciales y temporales	39
2.2.5. Metrología speckle.....	40
CAPITULO III.....	41
3.1. Biospeckle	41
3.2. Técnicas de análisis del biospeckle	42
3.2.1. Historia temporal de patrones speckle (THSP).....	42
3.2.2. Descriptor autocorrelación y espectro de potencia	45
3.2.3. Matrices de coocurrencias o comatriz y descriptor momento de inercia.....	46
3.2.4. Histograma.....	50
3.2.5. Energía o descriptor segundo momento angular.....	50
3.2.6. Descriptor Homogeneidad	50
3.2.7. Descriptor contraste de Briers.....	51

3.2.8. Descriptores de Fujii y diferencias generalizadas.....	52
3.2.9. Descriptor LASCA (<i>Laser Speckle Contrast Analysis</i>).....	53
3.2.10. Descriptor LASTCA (<i>Laser Speckle Temporal Contrast Analysis</i>).....	54
CAPITULO IV	55
4.1. Muestras vegetales.....	57
4.2. Preparación de las muestras para el arreglo de biospeckle (fig.11).....	59
4.3. Espectro de absorbancia de las muestras	59
4.4. Procesamiento y análisis de resultados de biospeckle.....	61
4.4.1. Prueba de calibración utilizando una muestra de estructura rígida.....	63
4.4.2. Muestra 1	66
4.4.3. Muestra 2	67
4.4.4. Muestra 3	68
4.4.5. Muestra 4	69
4.4.6. Muestra 5	70
4.4.7. Muestra 6	71
4.5. Medida del tiempo medio de deshidratación artificial	75
4.5.1. Preparación de las muestras	76
4.5.2. Muestra 1	77
4.5.3. Muestra 2	78
Conclusiones y perspectivas	81
Bibliografía	83

Lista de figuras

Fig.1. Imagen de un patrón de speckle objetivo generado por un difusor de vidrio.....	24
Fig. 2. Esquema de speckle objetivo.....	26
Fig. 3. a. Patrón de un patrón de speckle objetivo de un difusor de vidrio y b. su respectivo histograma.	27
Fig. 4. Secuencia de patrones de speckle objetivo observados a diferentes distancias de la muestra.	28
Fig. 5. Esquema del speckle subjetivo.	29
Fig. 6. a. Patrón de speckle y b. su respectivo histograma.....	29
Fig. 7. Formación de la matriz de THSP.....	44
Fig. 8. Matriz THSP del speckle a. estático y b. dinámico.	44
Fig. 9. Ejemplo representativo del cálculo de la MCO de la THSP a. dinámico y b. estático.....	48
Fig. 10. THSP y sus respectivas matrices de coocurrencia para diferentes fases de actividad del speckle organizadas desde la a. con mayor speckle dinámica, hasta la d. con menor speckle dinámico.....	49
Fig. 11. Esquema experimental utilizado en el registro de imágenes speckle de muestras biológicas estudiadas.	55
Fig. 12. Fotografías de las muestras objetos de prueba para el análisis de biospeckle.	57
Fig. 13. Espectros de absorbancia de cada muestra, medido con el espectrómetro PASCO.	61
Fig. 14. a. Imagen del Patrón de speckle en $t=100$ s, b. Matriz THSP, c. Comatriz de la THSP .	63
Fig. 15. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos	64
Fig. 16. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad.....	65

Fig. 17. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP	66
<i>Fig. 18. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos</i>	66
Fig. 19. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad.....	66
Fig. 20. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP	67
<i>Fig. 21. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos</i>	67
Fig. 22. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad.....	67
Fig. 23. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP	68
<i>Fig. 24. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos</i>	68
Fig. 25. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad.....	68
Fig. 26. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP	69
<i>Fig. 27. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos</i>	69
Fig. 28. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad.....	69
Fig. 29. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP	70
<i>Fig. 30. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos</i>	70

Fig. 31. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA),
(d). Homogeneidad.....70

Fig. 32. (a). Imagen del Patrón de speckle en t=100s, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP
.....71

Fig. 33. Comatriz de cada patrón speckle en t=1, 600, 1199, 1798 segundos71

Fig. 34. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA),
(d). Homogeneidad.....71

Fig. 35. (a). Montaje experimental con la fuente de calor, (b). Fuente de calor.75

Fig. 36. Temperatura del sistema desde que se enciende la fuente de calor, hasta que alcanza una
temperatura estable.....76

Fig. 37. (a). Imagen del Patrón de speckle en t=100s, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP
.....77

Fig. 38. Comatriz de cada patrón speckle en t=1, 600, 1199, 1798 segundos77

Fig. 39. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA),
(d). Homogeneidad.....77

Fig. 40. (a). Imagen del Patrón de speckle en t=100s, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP
.....78

Fig. 41. Comatriz de cada patrón speckle en t=1, 600, 1199, 1798 segundos78

Fig. 42. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA),
(d). Homogeneidad.....78

Lista de tablas

Tabla 1. P.P.: Profundidad de penetración; $\ell=10$ mm: espesor del portamuestras;.....	60
Tabla 2. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.....	66
Tabla 3. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.....	67
Tabla 4. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.....	68
Tabla 5. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.....	69
Tabla 6. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.....	70
Tabla 7. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.....	71
Tabla 8. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 1 h y 30 minutos.	77
Tabla 9. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 2 horas.	78

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN, PROBLEMA, OBJETIVOS

1.1. Introducción

El estudio de la medición del comportamiento del speckle producido por una muestra biológica, es decir, el speckle dinámico o biospeckle, ha sido objeto de investigación desde finales de los 70 [14]. En estos primeros estudios se observó que dicha medición da información de la superficie observada. Esto ha desencadenado la implementación de esta técnica en diferentes aplicaciones como el estudio de secado de pinturas que analiza la actividad del speckle en una muestra no biológica [30], el monitoreo de la calidad de semillas vegetales [38, 39, 45], el tiempo de maduración de alimentos [3], la evaluación de la acción de posibles nuevos fármacos en determinadas bacterias [6, 7], así como la detección de enfermedades mediante el estudio del flujo sanguíneo [1, 4, 5, 11], cambios en la piel [1, 5], esto solo nombrando algunas de las aplicaciones que ya han sido investigadas.

Este trabajo de investigación se enfoca en las aplicaciones del biospeckle, es decir, el análisis del speckle en tejido vivo. Para esto se llevó a cabo una revisión bibliográfica del biospeckle [1-45] desde sus inicios hasta la fecha, tomando como referencia las diferentes técnicas que se han ido desarrollando en el transcurso de los años. Para iniciar con este trabajo, se obtuvo el espectro de absorción para cada muestra descartando así que el haz incidente generara algún cambio en la muestra que alterara el comportamiento de esta al momento de realizar el monitoreo de su actividad. Se utilizaron cinco técnicas de descripción para estimar el tiempo de vida de cada

muestra con el objetivo de realizar una comparación entre dichos descriptores y determinando cuales son más adecuados para la caracterización de las muestras analizadas en el laboratorio.

Los descriptores utilizados para este estudio fueron: la comatriz, el momento de inercia, el segundo momento angular, el coeficiente de correlación y la homogeneidad. Estos descriptores se calculan a partir de la matriz THSP (*Temporal History Speckle Pattern*), que es una matriz construida de una secuencia de patrones de speckle capturados para una muestra en un intervalo de tiempo y periodo constante. Para calcular tales descriptores estadísticos, se desarrolló un algoritmo en lenguaje MATLAB que permite el procesamiento de secuencias de imágenes de speckle generadas por una misma muestra, y capturadas en el tiempo a través de una cámara CMOS. El programa, además, construye la matriz THSP y a partir de ella calcula la dinámica de cada descriptor, ejemplo, el tiempo medio de atenuación de su actividad biológica, la cual podría ser un proceso de deshidratación natural o provocada.

El presente informe consta de cinco capítulos. Los capítulos I y II están enfocados en la historia y descripción de los conceptos que fueron necesarios para el desarrollo de esta investigación, como la formulación matemática y los tipos de speckle de acuerdo a su montaje experimental. En el capítulo III se habla del biospeckle y de algunas de las técnicas que se utilizan para evaluar el comportamiento de éste; se describen y se desarrollan ejemplos del cálculo de los descriptores estadísticos. De las técnicas abarcadas, se escogieron las cinco que se mencionaron en el resumen; en el capítulo IV se muestran los espectros de absorción para cada muestra caracterizada en el laboratorio, determinando la baja influencia del haz del láser en la actividad de la muestra, así como los resultados obtenidos al aplicar dichas técnicas a los patrones de speckle de las muestras.

1.2. Antecedentes y justificación

El estudio del biospeckle o speckle dinámico se inició en los 70 con la implementación de ensayos ópticos con la técnica PSI (*Phase Shifting Interferometry*). Ésta registra electrónicamente una serie de interferogramas mientras se cambia la fase de referencia del interferómetro. La fase del frente de onda está codificada en las variaciones del patrón de intensidades de los interferogramas registrados y la fase se recupera mediante un simple cálculo punto a punto [14].

En 1991 los investigadores Yoshihisa Aizu y Toshimitsu Asakura hablaron acerca del fenómeno del biospeckle y su aplicación a la evaluación del flujo sanguíneo; en el trabajo que realizaron, implementaron algunos métodos para la evaluación del flujo sanguíneo en la superficie de la piel, órganos internos y fondo ocular. Los resultados experimentales mostraron que el grado de flujo sanguíneo es reflejado sensiblemente por las propiedades de la variación del tiempo de los biospeckles y que esto podía ser utilizado para el monitoreo del flujo sanguíneo. Se conocía que la fluctuación del biospeckle tenía varias componentes de frecuencia de acuerdo con el área de prueba de los objetos vivos que estuvieran siendo medidos, pero después de esto, se encontró que reflejaban sensiblemente la actividad del flujo sanguíneo como la velocidad. Esto fue bastante útil para evaluar de forma no invasiva el flujo sanguíneo y analizar el comportamiento dinámico de los biospeckles, que depende de varios factores dentro de los objetos vivos tales como las estructuras espaciales de los tejidos y la red de vasos y sus características de absorción y difusión [1].

Durante los siguientes años se siguió investigando el biospeckle como técnica de metrología óptica en varias ramas de estudio [13-16, 22, 29-33]. Entre el 2011 y el 2016, investigadores como E.E. Ramirez Miquet et al, realizaron trabajos de aplicación de esta técnica en áreas como la descripción de la actividad de células bacterianas como la E. Coli y la evolución y comportamiento de esta en un tiempo determinado [2]. También se estudiaron procedimientos para la caracterización de la

actividad del speckle y su sensibilidad de respuesta con variaciones en la frecuencia y amplitud mientras el movimiento de inercia varía con amplitud y frecuencia por dos técnicas diferentes. Esto con el objetivo de ampliar el estudio en muestras biológicas donde la dinámica de los fenómenos internos es poco conocida, tal como el caso de la madurez de las frutas [3]. Al igual, se estudiaron algunos métodos en el análisis de imagen para las imágenes del flujo sanguíneo y el cambio de concentración sanguínea de los patrones de speckle [4]. Estos métodos fueron corroborados mediante la experimentación con una rata anestesiada; considerándose útil para aplicaciones médicas tales como la investigación detallada de la hemodinámica rápida y el metabolismo del oxígeno de las actividades fisiológicas y patológicas para futuros desarrollos, encontrando así que el método podría ser aplicado para un diagnóstico no invasivo de enfermedades vasculares en vivo y monitoreando de inmediato las respuestas hemodinámicas que ocurrieran durante el ejercicio [4]. También, se investigó la propagación de la luz dentro del modelo de tejido de la piel en relación con la longitud de onda de la luz láser de iluminación y la respuesta dinámica de los speckle para la velocidad del flujo sanguíneo por dos longitudes de onda de 780 nm y 830 nm en el infrarrojo cercano usando una capa de cerdo, una capa de sangre, la muñeca y dedos humanos; obteniendo alta sensibilidad en el flujo sanguíneo con velocidades lentas y rápidas. Por lo que el uso de longitudes de onda más largas en la región del infrarrojo cercano se hace ventajoso en la modalidad de imagen del flujo sanguíneo tal como en el flujo sanguíneo arterial con pulsación por un latido del corazón o con un repentino cambio inducido por varias causas. En este trabajo se recomendó la aplicación del método a la monitorización simultánea del flujo sanguíneo y la saturación de oxígeno en los tejidos con alta sensibilidad y en tiempo real [5].

Asimismo, en otro trabajo, se estudió el método laser biospeckle usado para monitorear la acción de una droga específica sobre parásitos de *T. Cruzi* (*Trypanosoma cruzi*). Los resultados experimentales de este, demostraron la efectividad de método propuesto. Se midieron parámetros

del speckle como la correlación espacio temporal y el tamaño del grano de speckle para evaluar la acción inmediata de la droga durante un muy corto período de incubación. Se probó la efectividad de la acción del epirubicin sobre membranas de *T. Cruzi* como un efecto instantáneo y se pudo analizar la actividad de los parásitos en presencia o ausencia de la droga y además se detectaron los efectos de factores externos físicos, así como la evaporación del medio. Esto llevó a considerar que el método podía ser útil para pruebas adicionales, no solo la actividad instantánea de las drogas candidatas para el *T. Cruzi* sino también otras drogas sobre el mismo y otros sistemas biológicos [6].

Al igual se han hecho diferentes pruebas en las que se discuten los métodos usados para el procesamiento del speckle, como lo son el LASCA (*Laser Speckle Contrast Analysis*) o el MHI (*Motion History Image*), entre otros, buscando con cuales se logran resultados con menor pérdida de resolución y definición o algunas combinaciones de estos métodos para mejorar el procesamiento de la técnica speckle. Para el estudio en el que se investiga la acción de una nueva droga en el parásito *T. Cruzi*, los investigadores utilizaron los dos métodos mencionados, concluyendo que los resultados sugieren que ambos métodos MHI y IM (*Inertia of Moment*) podrían ser usados para promover pruebas de la actividad instantánea del *T. Cruzi* u otros sistemas biológicos con drogas candidatas [7].

Una de estas investigaciones se hizo para estudiar la deformación de una barra de aluminio el cual se hizo con un interferómetro DSPI (*Digital Speckle Pattern Interferometry*) [8]. Se obtuvieron resultados experimentales del comportamiento mecánico de la barra de aluminio cuyos campos de desplazamiento fueron consecuencia de cargas mecánicas. Con el desarrollo de este trabajo, se corroboró una vez más que con el uso de esta técnica óptica los resultados se obtienen en tiempo real, no son destructivos, ni tampoco requiere contacto con el objeto de medida, siendo más

ventajosa frente a métodos mecánicos tradicionales por lo que resulta aplicable a desplazamientos tan pequeños del orden de micras; así como que el equipo utilizado para implementar esta técnica tiene un bajo costo, lo que lo hace accesible. Esto deja el método como una excelente herramienta para inspeccionar materiales ópticamente rugosos de cualquier geometría, siempre y cuando sea posible iluminar la zona de análisis, la principal limitación es la alta posibilidad de perturbaciones vibracionales por lo que es indispensable un ambiente controlado [8].

En el 2019, con los avances que se han presentado en la tecnología y en la técnica de metrología con biospeckle, Martín A. Toderi et al, realizaron un trabajo en el cual se investigó la dinámica de los glóbulos rojos humanos (RBC) en el plasma, para diferentes concentraciones, 25% y 50% por medio del análisis de láser de biospeckle. Estas muestras, se introdujeron en un tubo capilar y se iluminaron con un láser He-Ne para obtener el patrón de biospeckle desde la luz dispersa hacia adelante y hacia los lados. Se calcularon parámetros de biospeckle como el coeficiente de correlación y el momento de inercia para diferentes anchos de banda de frecuencia con el fin de evaluar su sensibilidad y versatilidad. Se utilizó un filtro basado en la transformación discreta de wavelets para descomponer la actividad de muestra registrada. Se observó una relación entre el momento de inercia y la relación volumen de plasma con respecto a los glóbulos rojos. Se definió y analizó el índice de correlación que mide el nivel de correlación de las imágenes de biospeckle. En este trabajo se hizo la consideración de que el análisis por biospeckle es una técnica adecuada para el desarrollo de nuevas herramientas ópticas no invasivas para el diagnóstico clínico en patologías vasculares [9].

En este mismo año, Marcos Diego Catalano, Fernando Pujaico Rivera y Roberto A Braga, enfocaron su trabajo a probar las condiciones claves para adoptar el DLS utilizando un dispositivo

móvil, un teléfono inteligente, para capturar y analizar los datos. En la adquisición de datos se probó la capacidad de configurar el ISO, el balance de blancos, y para arreglar el zoom. La velocidad de adquisición de la imagen o el video también fue probada, el último asociado a la extracción de funciones de trama. El análisis de los datos fue evaluado, primero probando las condiciones para programar las ecuaciones de los métodos tradicionales, así como su tiempo consumiendo sin fallas ni descansos. Las pruebas mostraron que el DLS puede implementarse de manera factible en teléfonos inteligentes, pudiendo ensamblar imágenes con la calidad y velocidad necesarias para DLS, así como, poder ejecutar los métodos principales en un tiempo razonable, sin interrupciones. El logro abrió una manera accesible de usar el DLS en muchas áreas de conocimiento por parte de los usuarios finales, así como una forma de crear sistemas de inserción utilizando el smartphone o tablets, incluso como parte del equipo [10].

También en el 2019, los investigadores Shubhashri Kumari¹ y Anil Kumar Nirala, informaron sobre el monitoreo cualitativo y cuantitativo de biopelícula del flujo sanguíneo funcional en la mano humana con algoritmos basados en la intensidad. El método de procesamiento utilizado fue el Fujii, abordado por primera vez para analizar cambios fisiológicos debidos al efecto de diferentes tratamientos como agua fría y caliente en la palma de la mano, que pueden ser útiles para examinar enfermedades cardiovasculares y relacionadas, así como el uso de exfoliantes faciales, cremas de belleza y ungüentos para aliviar el dolor, aplicados también sobre la misma zona; esto con el fin de encontrar la mejor opción entre estos. Para esto, se evaluó el cambio en la actividad del flujo sanguíneo producido cuando estos son aplicados; donde además de los resultados encontrados, también se encontró que la persona que tiene más hemoglobina y presión arterial más alta puede tener más flujo sanguíneo o actividad media, dato que puede ser útil para el tratamiento de la hipertensión. Otro hallazgo fue que, aunque los tratamientos con agua fría y caliente se pueden

utilizar para aumentar el flujo sanguíneo, la temperatura debe mantenerse según la necesidad y la sensibilidad de la muestra [11].

A comienzos 2020, Minoru Hirai, Daiki Endo y Hiroki Gonomeb, publicaron un trabajo en el que estudian los efectos del sonido sobre el crecimiento de las plantas y su rendimiento. Ya que los métodos que generalmente se usan para investigar los efectos del sonido llevan mucho tiempo o son muy destructivos, propusieron la técnica de biospeckle para investigar la respuesta de las plantas a un estímulo de sonido. Los biospeckles de las hojas de las plantas se grabaron cuando estas fueron expuestas a diferentes estímulos de sonido, desde música clásica y rock hasta una sola frecuencia de sonido por un minuto y la actividad biospeckle (BA) fue calculada. Se demostró que hubo un cambio en la actividad del tejido de la planta para cada frecuencia y que tal dependencia era más fuerte debido a la edad de la planta con el efecto de ser más grande para la planta más joven [12].

Al ser el biospeckle una técnica que mide la dinámica de tejido vivo en el orden de las micras, genera una gran utilidad en muchas aplicaciones de diferentes áreas. Esta técnica mide varios parámetros relacionables con características físicas de los objetos de análisis y lo más importante es que se podrían estimar en tiempo real y de una manera no invasiva si se utiliza una radiación láser de frecuencia e intensidad adecuada, tal que no actúe sobre las propiedades físicas de la muestra.

Esta técnica se ha utilizado para observar tanto procesos no biológicos entre los que se encuentran el secado de pinturas [30] o pruebas de resistencia de los materiales [8], como procesos biológicos en mediciones de madurez, humedad y duración de frutas y verduras desde su siembra, hasta su cosecha y venta [15, 16, 27, 38, 39, 42, 43, 45]; en la búsqueda de medicamentos que puedan ser

aprobados para el uso contra algunas bacterias o parásitos [2, 6, 7, 30, 40]; en la parte biomédica implementándola en el análisis del flujo sanguíneo, en tomografías, endoscopias y se ha estudiado su posible uso para detectar enfermedades como la leucemia (cáncer en la sangre) de manera no invasiva y de forma inmediata por medio del análisis del flujo sanguíneo [1, 4, 5, 9, 11]; siendo estas, solo algunas de sus múltiples aplicaciones.

El desarrollo de la técnica de biospeckle y el prototipo del mecanismo que se desea llevar a cabo en este proyecto, es de gran utilidad para otros programas de la universidad, como salud, microbiología, algunas ingenierías, entre otros. Estos programas no cuentan con un mecanismo que pueda realizar este tipo de mediciones y que aumentaría la eficiencia y eficacia a la hora de llevar a cabo procesos como analizar muestras, monitorear el crecimiento de cepas o los efectos de medicamentos aplicados en diferentes sistemas biológicos, optimizar los tiempos de cosecha de los alimentos midiendo parámetros como la madurez, la humedad y el tiempo que duran en descomponerse, esto solo nombrando algunos.

En este trabajo se implementó la primera fase de una técnica automatizada para realizar estudios de bioactividad. Esto quiere decir que se diseñó e implementó un sistema óptico-digital que permite llevar a cabo la observación y estimación de la bioactividad a través del procesamiento del speckle generado por una muestra de tejido vivo, incluso de cualquier material que produzca speckle dinámico y se desarrolló un algoritmo para el funcionamiento de este y el tratamiento de los datos obtenidos en los procesos.

1.3. Planteamiento del problema

¿Se puede construir un arreglo óptico que permita estimar el tiempo de vida medio de un material biológico utilizando la técnica de biospeckle, sin que la muestra sufra efectos invasivos por acción de la radiación?

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Estudiar las características de la técnica de biospeckle para construir un prototipo óptico-digital que permita medir el parámetro de tiempo de vida medio de material biológico sin que sufra efectos invasivos.

1.4.2. Específicos

- Diseñar un arreglo óptico- digital de la técnica de biospeckle que permita medir el tiempo de vida medio de material biológico.
- Construir el arreglo óptico- digital diseñado de la técnica de biospeckle que mida el tiempo de vida medio de material biológico.
- Desarrollar una herramienta computacional de control del arreglo experimental, registro y procesamiento de patrones de biospeckle, conducente a determinar el parámetro de tiempo de vida media de muestras de material biológico sensible a radiación láser de baja potencia y no invasivo para la muestra por efectos de absorción.
- Establecer por espectroscopia de absorción los tipos de muestras biológicas que podrían ser caracterizadas mediante la técnica de biospeckle implementado, sin que sufran efecto invasivo debidos a la radiación láser utilizada.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Speckle

A partir de la invención del láser en 1960, se dispone de una fuente luminosa con un grado de coherencia nunca antes logrado [13]. Debido al aspecto granular que presentan los objetos cuando son iluminados de esta forma, el speckle se constituyó en un gran inconveniente para la holografía ya que degrada la calidad de la imagen. Es por ello que varios investigadores desarrollaron métodos para reducir el speckle en imágenes holográficas [14].

A medida que se lograban avances para disminuir la presencia del speckle como factor de ruido en los sistemas ópticos y en las técnicas de radar, surgían las técnicas de fotografía e interferometría speckle. Estas encontraron rápidamente aplicaciones metrológicas en la determinación de desplazamientos, deformaciones, tensiones, fracturas, vibraciones, etc. de objetos difusores [14].

Este fenómeno se conoce en inglés como speckle y se produce cuando la superficie iluminada es ópticamente rugosa, es decir cuando las diferencias de altura entre puntos vecinos de la superficie son del orden o mayores a la longitud de onda del láser utilizado. Estas ondas se extienden con fases iniciales que varían aleatoriamente. Los caminos ópticos recorridos por estos frentes de onda son distintos para cada punto del plano de la observación y la superposición coherente de estas ondas da lugar a un patrón de interferencia cuyas intensidades también varían al azar [15] [13].

En estos puntos de interferencia constructiva o destructiva se encuentra la formación de granos claros y oscuros, respectivamente, así como también valores intermedios. Tales características dan carácter estadístico al granulado óptico [15].

La figura 1 muestra la imagen de un patrón de speckle subjetivo obtenida mediante el arreglo experimental sé que observa en la figura 5; se utilizó un láser HeNe de 632 nm de longitud de onda sobre un difusor.

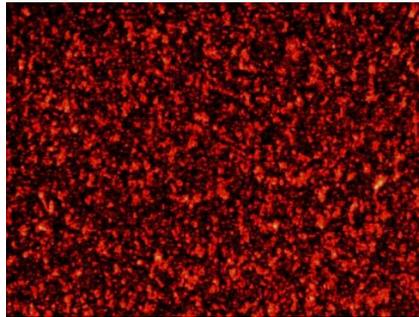


Fig.1. Imagen de un patrón de speckle objetivo generado por un difusor de vidrio.

La distribución aleatoria del campo óptico se puede modificar de manera determinística debido a deformaciones o desplazamientos de la superficie dispersora y por esta razón se puede aprovechar para estudiar características de la misma [13].

Originalmente, las distribuciones de speckle se registraban en películas fotográficas para su posterior procesado con métodos ópticos, pero estas técnicas eran inadecuadas para la realización de mediciones en ambientes industriales. Más adelante, las distribuciones de speckle se registraron usando cámaras de TV y el procesado de las imágenes se realizó electrónicamente, técnica conocida como Interferometría Electrónica de Speckle o ESPI (en inglés, *Electronic Speckle Pattern Interferometry*) [13].

Posteriormente, el desarrollo de hardware y software hizo posible el uso de cámaras de carga acoplada (CCD, en inglés, *Charge-Coupled Device*) conectadas a computadoras que poseen placas de adquisición y algoritmos de procesamiento de señales, a modo de poder almacenar y visualizar en tiempo real las imágenes adquiridas y los resultados de interés. Estos desarrollos dieron origen

a la Interferometría de Speckle Digital o DSPI (en inglés, *Digital Speckle Pattern Interferometry*), y de igual manera a la Interferometría de Speckle Temporal o TSPI (en inglés, *Temporal Speckle Pattern Interferometry*). En DSPI se computa la deformación del objeto entre dos estados, antes y después de la deformación y el análisis de datos se realiza en forma espacial. En TSPI se adquiere una secuencia de imágenes durante la historia de la deformación del objeto y el campo de desplazamientos queda codificado en un conjunto de $N_m \times N_n$ señales temporales, donde N_m y N_n corresponden a las dimensiones de las imágenes en la dirección horizontal y vertical, respectivamente. La técnica de TSPI es más ventajosa que la de DSPI en lo que compete a inmunidad al ruido, sensibilidad y rango de medición [13].

Para obtener datos cuantitativos de los interferogramas, es necesario derivar la información de fase de ellos, ya que las cantidades físicas de interés se calculan a partir de las diferencias de caminos ópticos que producen los cambios de fase. Así, que el paso central de este punto de vista es la determinación de la fase registrada en intensidad por medio de la interferencia [14].

El speckle contiene información sobre la fuente de luz incidente, la posición relativa entre la superficie que lo produce, el plano de observación y las propiedades de dispersión del objeto iluminado. Cualquier variación de uno de estos parámetros provoca un cambio en la estructura del speckle, que puede ser evaluado comparando los speckles obtenidos, antes y después, de haberse producido dicha variación [14].

El origen de la dependencia de estos parámetros se puede entender, con grandes simplificaciones, similares a la difracción de agujeros circulares. Desde este punto de vista, cada grano es un patrón de difracción con un máximo central, cuya intensidad disminuye hasta cancelarse en los bordes [15].

2.1.1. Tipos de speckle

2.1.1.1. Speckle objetivo

El fenómeno se puede observar en dos configuraciones diferentes. La primera se llama propagación de espacio libre, en el que ningún elemento óptico se coloca entre la superficie de dispersión y el plano de registro. En esta configuración, en general, solo un punto de la superficie está iluminado por un rayo láser y la luz dispersa se registra en una película o sensor CCD colocado en un plano distante, llamado el plano Fraunhofer (lejano). El patrón observado en esta configuración, también se llama speckle objetivo [15].

La figura 2 muestra un esquema experimental típico para la obtención del patrón de speckle objetivo. En él se encuentra un haz de luz láser incidiendo sobre una superficie ópticamente rugosa. Ésta dispersa la luz de manera aleatoria produciendo un patrón de speckle. Se denomina speckle objetivo porque entre la muestra y el sensor no media un arreglo formador de la imagen del patrón de speckle.

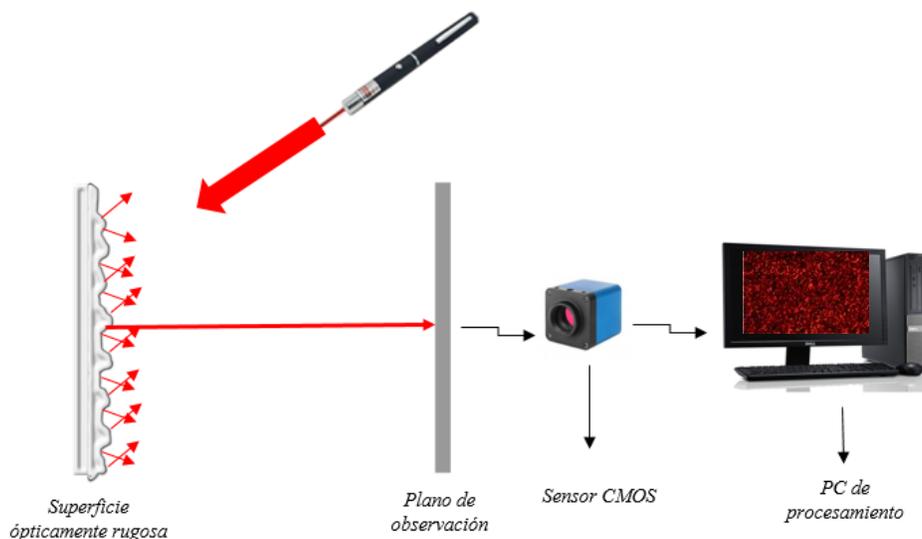


Fig. 2. Esquema de speckle objetivo

En la figura 3 se puede observar un patrón de speckle objetivo capturado con el montaje experimental diseñado en este trabajo y su respectivo histograma.

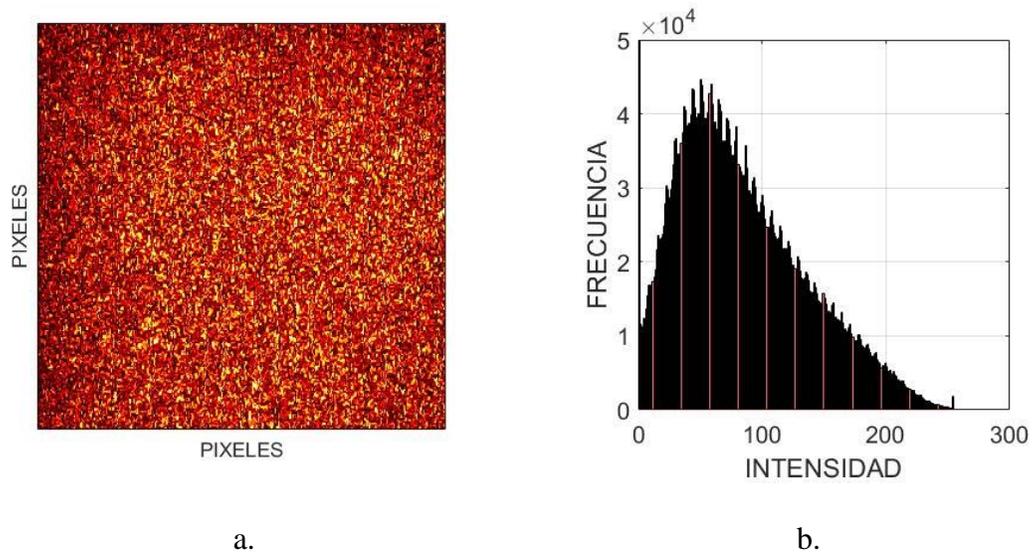


Fig. 3. a. Patrón de un patrón de speckle objetivo de un difusor de vidrio y b. su respectivo histograma.

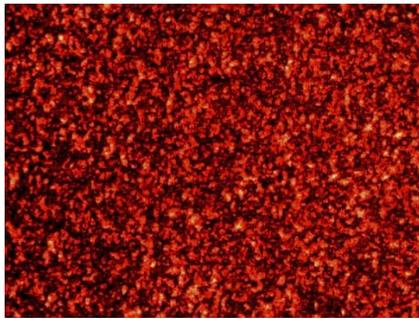
El origen de su nombre, speckle objetivo, se debe justamente a que no depende del sistema óptico empleado para visualizarlo [13]. Suponiendo que la superficie rugosa está situada en el plano (x,y) e ilumina con un haz coherente de longitud de onda λ , entonces el tamaño medio (diámetro medio) de grano speckle está dado por:

$$d_{sp} = \frac{\lambda z}{\Phi} \quad (1)$$

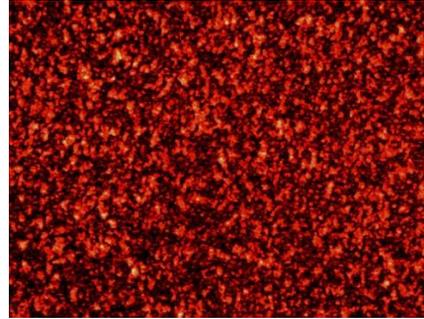
En este caso, el tamaño medio de un grano depende únicamente de la longitud de onda del haz incidente (λ), del diámetro del área iluminada (Φ) y de la distancia entre la superficie rugosa y el plano de observación (z) [13].

La Figura 4 muestra una secuencia de patrones de speckle objetivo de la misma muestra, pero observados a diferentes distancias z . A medida que aumenta la distancia, también aumentan los

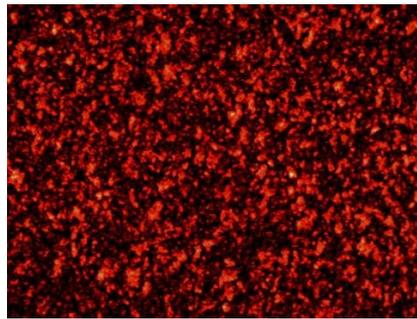
tamaños de los granos constituyentes del patrón. Estos tamaños se calcularon determinando el diámetro del área iluminada (2.54 mm^2), con un láser He-Ne de 632nm .



a) $Z=17.5\text{cm}$, $d_{sp}=43.05 \mu\text{m}$



b) $Z=18\text{cm}$, $d_{sp}=44.79 \mu\text{m}$



c) $Z=19.5\text{cm}$, $d_{sp}=48.52 \mu\text{m}$

Fig. 4. Secuencia de patrones de speckle objetivo observados a diferentes distancias de la muestra.

2.1.1.2. Speckle subjetivo

Para la segunda configuración llamada de plano imagen de la superficie que produce la distribución de speckle mediante un sistema óptico formado por una lente y una pupila circular de diámetro variable (diafragma); en este caso el speckle se denomina subjetivo.

En la figura 5 se puede observar un esquema experimental típico para la obtención del patrón de speckle subjetivo. En él tenemos un haz de luz láser incidiendo sobre una superficie rugosa donde la dispersión realizada se hace pasar a través de una lente que es el sistema formador de imagen.

Posteriormente se hace el registro en el tiempo de dicho patrón y se procede a realizar el procesamiento de los datos.

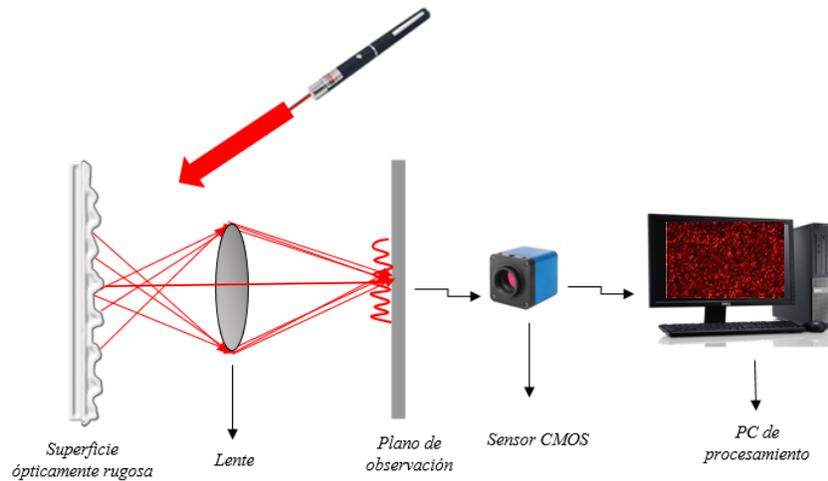


Fig. 5. Esquema del speckle subjetivo.

En la figura 6 se puede observar un patrón de speckle subjetivo capturado con el montaje experimental diseñado en este trabajo y su respectivo histograma.

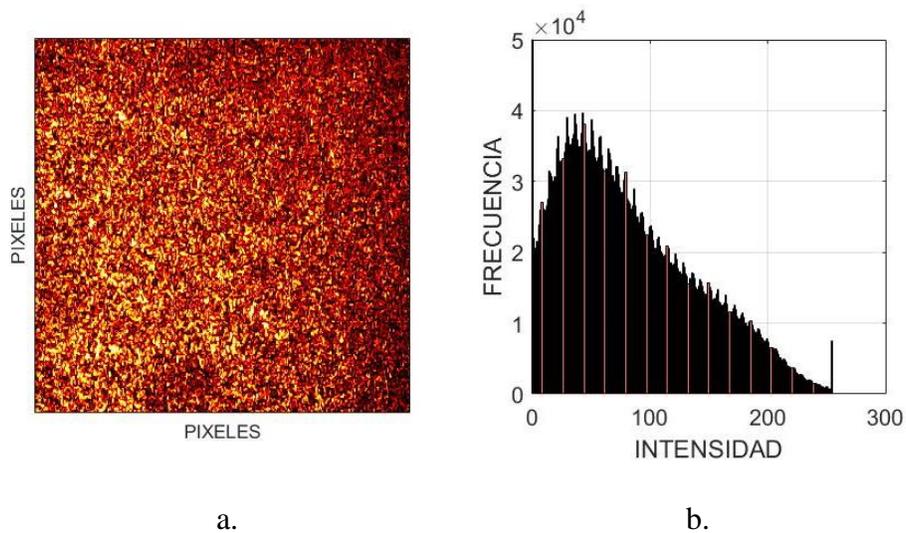


Fig. 6. a. Patrón de speckle y b. su respectivo histograma

Debido a la presencia de la lente, las variaciones de intensidad en el plano de observación tienen su frecuencia espacial acotada por el límite de difracción y de este modo queda determinado el mínimo tamaño de grano de speckle que se puede observar. El tamaño medio d_{sp} de un grano de speckle en el plano de observación se estima como el radio del disco de Airy, o sea:

$$D_{sp} = 1,22 \frac{\lambda \cdot z_i}{\Phi} \quad (2)$$

Donde (z_i) es la distancia de la lente al plano de observación y (Φ) es el diámetro de la misma. D_{sp} (tamaño medio del grano) también se conoce como celda de resolución. Por lo tanto, cada pixel de la cámara CCD debe ser capaz de detectar correctamente a dicha celda y el tamaño del pixel deber ser igual o mayor que la dimensión media del grano de speckle subjetivo.

Si f es la distancia focal de la lente y M_g es su magnificación, entonces:

$$z_i = f(1 + M_g) \quad (3)$$

Teniendo en cuenta que la abertura numérica de la lente es $AN=f/\Phi$, reemplazando en la ecuación anterior se obtiene el tamaño medio de un grano de speckle objetivo sobre el plano de observación como [13]:

$$D_{sp} = \frac{1,22\lambda f(1+M_g)}{\Phi} \quad (4)$$

Al ser un patrón de speckle un fenómeno aleatorio, solo puede ser descrito estadísticamente. Esta naturaleza estadística ha sido estudiada desde el punto de vista teórico y experimental por muchos investigadores, llegándose a establecer que sus propiedades estadísticas están íntimamente conectadas a las características estadísticas del objeto difusor y al grado de coherencia de la luz que lo produce [14].

2.2. Análisis del speckle

El análisis de las propiedades estadísticas del speckle se simplifica si se asumen las siguientes hipótesis:

- i. La luz utilizada es monocromática y esta polarizada linealmente.
- ii. El medio dispersor no despolariza la luz, es decir que la luz difundida también esta polarizada linealmente.
- iii. El número de elementos dispersores que contribuyen a la formación del speckle es muy grande y del mismo orden de magnitud para todos los puntos de la distribución.
- iv. Las áreas dispersoras de la superficie no están correlacionadas entre sí y la amplitud de una dada componente no guarda relación con su fase. Por lo tanto, la amplitud y fase de las ondas elementales que originan el speckle son variables aleatorias independientes entre sí.
- v. Dado que la superficie difusora es ópticamente rugosa, la fase de las ondas elementales es una variable aleatoria de distribución uniforme en el intervalo $(-\pi, \pi)$.

Si estas cinco hipótesis se garantizan, la distribución obtenida se denomina speckle completamente desarrollado y en caso contrario se llama speckle parcialmente desarrollado [13].

El análisis de estas configuraciones del patrón de speckle se fundamenta en dos estadísticas, de primer y segundo orden. La determinación de la FDP (Función de densidad de probabilidad) de las amplitudes, fases e intensidades de campo en un patrón de speckle se denomina estadística de primer orden. Los estimadores de primer orden más utilizados en la descripción del speckle son la media y la varianza de las intensidades. La determinación de la función de auto correlación y la densidad espectral de potencia se denomina estadísticas de segundo orden. Los coeficientes de correlación también son herramientas muy utilizadas en este tipo de estudios [15].

2.2.1. Estadísticas espaciales de primer orden

Las estadísticas espaciales de primer orden permiten, a partir del cálculo de la media y varianza de las intensidades, medir el contraste del patrón de speckle. Las estadísticas espaciales de segundo orden proporcionan información sobre el tamaño del grano.

Sea $u_k(x, t)$ la representación de una componente del campo eléctrico en un punto de observación x , en un instante t y con una velocidad angular ω :

$$u_k(x, t) = a_k(x) \exp\{i\omega t\} \quad (5)$$

donde $a_k(x)$ representa un fasor elemental de la amplitud compleja del campo:

$$a(x) = |a(x)| \exp\{i\theta(x)\} \quad (6)$$

siendo θ la fase del campo eléctrico.

La suma de las contribuciones de un gran número de fasores elementales toma la forma:

$$A(x) = \sum_{k=1}^N \frac{1}{\sqrt{N}} a_k(x) = \frac{1}{\sqrt{N}} |a_k| \exp\{i\theta_k\} \quad (7)$$

donde $A(x)$ representa la amplitud total del campo eléctrico.

La deducción del FDP (función de densidad de probabilidad) de la amplitud y la intensidad en un patrón de speckle completamente desarrollado está dada por:

$$A^{(r)} = \text{Real}[A(x)] = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| \cos \theta_k \quad (8)$$

$$A^{(i)} = \text{Imag}[A(x)] = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| \sin \theta_k \quad (9)$$

Después de realizar algunas operaciones matemáticas, tenemos que $A^{(r)}$ y $A^{(i)}$ tienen valor medio igual a cero y varianza de las amplitudes igual a:

$$\sigma_A^2 = \langle [A^{(r)}]^2 \rangle - \langle A^{(r)} \rangle^2 = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |a_k|^2 \rangle}{2} \quad (10)$$

Las amplitudes obtenidas tienden a una distribución normal alrededor de sus respectivos valores medios calculados. La FDP conjunta de $A(r)$ y $A(i)$ en el plano complejo es una función gaussiana circular, dada por:

$$p_{r,i}(A^{(r)}, A^{(i)}) = \frac{1}{2\pi\sigma_I^2} \exp\left\{-\frac{([A^{(r)}]^2 + [A^{(i)}]^2)}{2\sigma_I^2}\right\} \quad (11)$$

donde σ_I es la varianza de las intensidades.

A partir de esta ecuación, se puede obtener la FDP de intensidad $p_I(I)$ y fase $p_\theta(\theta)$ que será:

$$p_I(I) = \int_{-\pi}^{\pi} p_{I,\theta}(I, \theta) d\theta = \begin{cases} \frac{1}{2\sigma_A^2} \exp\left\{\frac{-I}{2\sigma_A^2}\right\} & I \geq 0 \\ 0 & \text{de otra forma} \end{cases} \quad (12)$$

$$p_\theta(\theta) = \int_0^{\infty} p_{I,\theta}(I, \theta) dI = \begin{cases} \frac{1}{2\pi} & -\pi \leq \theta \leq \pi \\ 0 & \text{de otra forma} \end{cases} \quad (13)$$

De la varianza se puede concluir que el valor medio de la intensidad $\langle I \rangle = 2\sigma_A^2$. Reemplazando esta ecuación en la FDP de intensidad, se tiene:

$$p_I(I) = \frac{1}{\langle I \rangle} \exp\left\{\frac{-I}{\langle I \rangle}\right\} \quad (14)$$

La varianza de las intensidades del patrón puede ser calculada como:

$$\langle I^2 \rangle = \int_0^{\infty} I^2 p_I(I) dI = 2\langle I \rangle^2 \rightarrow \sigma_I^2 = \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 = \langle I \rangle^2 \quad (15)$$

Teniendo en cuenta la definición del contraste, $C = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle}$, se puede concluir que el contraste de un patrón speckle completamente desarrollado es igual a uno.

2.2.1.1. Suma incoherente de dos patrones speckle

En el caso de que los dos patrones de speckle sean independientes entre sí, se dice que esta suma es incoherente. Cada uno de los patrones individualmente cumple con el FDP de intensidad deducida anteriormente. Por lo tanto, la FDP de la suma será una combinación de dos distribuciones.

Realizando el producto de las funciones de cada patrón y aplicando una transformada inversa de Fourier se obtiene la FDP combinada de la suma de dos patrones:

$$p_I^{(2)}(I) = \frac{4I}{\langle I \rangle^2} \exp\left\{\frac{-2I}{\langle I \rangle}\right\} \quad (16)$$

Calculando el momento de segundo orden de esta FDP, la varianza y el contraste del patrón se pueden definir como:

$$\langle I^2 \rangle = \int_0^\infty I^2 p_I^{(2)} dI = \frac{3\langle I \rangle^2}{2} \rightarrow \begin{cases} \sigma_I^2 = \frac{\langle I \rangle^2}{2} \\ C = 0,7 \end{cases} \quad (17)$$

2.2.1.2. Suma con fondo uniforme

Un método utilizado en el análisis de biospeckle tiene su origen en el estudio de la superposición entre un patrón de speckle y un fondo uniforme [19].

Al agregar un patrón completamente desarrollado con un fondo incoherente y uniforme, es lógicamente razonable inferir que la intensidad del fondo (I_f) provoca un aumento en la intensidad promedio del patrón estático ($\langle I_E \rangle$) sin interferir con la varianza (σ_{I_2}). En estas condiciones, ya se ha observado que $\sigma_I^2 = \langle I_E \rangle^2$. Definiendo la contribución del fondo a la intensidad media total, es:

$$\rho = \frac{I_f}{\langle I \rangle}, \text{ donde } \langle I \rangle = I_f + \langle I_E \rangle \quad (18)$$

Reescribiendo la ecuación en función de la intensidad media resultante, se tiene que:

$$\rho = \frac{\langle I \rangle - \langle I_E \rangle}{\langle I \rangle} = 1 - \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \quad (19)$$

Es decir, a partir del contraste de un patrón completamente desarrollado, es posible establecer la contribución del fondo uniforme a la intensidad total.

2.2.2. Estadística temporal de primer orden.

La estadística de primer orden describe las propiedades de un patrón de speckle a lo largo del tiempo en un único punto, es decir no toma en cuenta las relaciones entre puntos diferentes.

De este análisis se encuentra una función densidad de probabilidad (FDP) para la amplitud compleja, la fase y la intensidad del frente de onda dispersado. También posibilita la obtención de una expresión para el contraste de los patrones de speckle [16].

En un instante t , en el plano de observación, la intensidad resultante viene dada por:

$$I(x, y; t) = |A_E(x, y) + A_M(x, y; t)|^2 \quad (20)$$

Donde $A_E(x, y)$ y $A_M(x, y)$ son amplitudes complejas de los componentes estacionario y móvil, respectivamente.

La varianza $\sigma_t^2(x, y)$ de las fluctuaciones temporales de la intensidad en un punto dado viene dada por:

$$\sigma_t^2(x, y) = 2I_E \langle I_M \rangle + \langle I_M^2 \rangle - \langle I_M \rangle^2 \quad (21)$$

Donde I_E e I_M corresponden a las intensidades de las componentes estacionaria y móvil, respectivamente. Si partimos de la hipótesis de que los patrones de speckle son completamente desarrollados, $\langle I_M^2 \rangle = 2\langle I_M \rangle^2$; entonces, la varianza queda de la siguiente forma:

$$\sigma_t^2(x, y) = 2I_E \langle I_M \rangle + \langle I_M \rangle^2 \quad (22)$$

Esto denota que el comportamiento de las intensidades a lo largo del tiempo depende de la posición en el plano de observación. Para que $\sigma_t^2(x, y)$ tenga algún significado, es necesario realizar un promedio espacial sobre una gran cantidad de puntos:

$$\langle \sigma_t^2(x, y) \rangle_{xy} = \langle I_E + I_M \rangle^2 - \langle I_E \rangle^2 \quad (23)$$

Recordando que $\langle I_E + I_M \rangle = \langle I_t \rangle_{xy}$ y que $\rho = \frac{\langle I_f \rangle}{\langle I \rangle}$, entonces la ecuación puede reescribirse de la siguiente forma:

$$\frac{\langle \sigma_t^2(x, y) \rangle_{xy}}{\langle I_t \rangle_{xy}^2} = 1 - (1 - \rho)^2 \quad (24)$$

La expresión muestra que a partir de la media espacial del contraste temporal se puede estimar la proporción de dispersión móvil en el patrón resultante. Despejando el parámetro ρ , entonces:

$$\rho = 1 - \left[1 - \frac{\langle \sigma_t^2(x, y) \rangle_{xy}}{\langle I_t \rangle_{xy}^2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (25)$$

Comparando ρ con el planteamiento realizado en la estadística espacial de primer orden, se observa que la diferencia radica en que aquí el índice ρ incorpora información sobre la variación temporal del patrón, mientras que antes solo se consideraban las variaciones espaciales [15].

Los resultados de esta estadística permiten explicar el aspecto granular de las distribuciones de speckle y porqué en cada punto de las mismas la intensidad más probable es cero [13].

2.2.3. Estadística de segundo orden.

Las estadísticas de segundo orden son una descripción de las distribuciones de tamaño e intensidad de speckles en una imagen. El método implica llevar la autocorrelación de la imagen a determinar los tamaños. Este método también se utiliza para determinar los cambios de intensidad en un solo píxel tomando la autocorrelación de su historial de tiempo [16].

Fue Gold Fisher, quien en 1965 estudió la estadística de segundo orden de los patrones de speckle con base en la función de autocorrelación, su transformada de Fourier y la densidad de potencia espectral (o espectro de Winner), que son las funciones más usadas para caracterizar la estadística de segundo orden.

2.2.3.1. La función de autocorrelación y la densidad espectral de potencia

En la autocorrelación, una determinada señal se compara consigo misma en diferentes puntos o instantes con el fin de evaluar el comportamiento de su evolución en el espacio o en el tiempo. Las estadísticas de segundo orden de los patrones de speckle tienen una gran analogía con los métodos de análisis normalmente empleados en la espectroscopia de batido de luz.

Sea una función $A(t)$ y su respectiva transformada de Fourier $A(w) = \mathfrak{F}\{A(t)\}$. La transformada de Fourier representa el espectro de frecuencia de $A(t)$. Siguiendo este razonamiento, $|A(w)|$ funciona como una densidad de amplitudes espectrales y $|A(w)|^2$ es proporcional a la energía por unidad de frecuencia. De manera similar, $|A(t)|^2$ es proporcional a la radiancia y la energía total emitida está dada por $\int_{-\infty}^{\infty} |A(t)|^2 dt$. Calculando la integral en términos de la transformada de Fourier, la irradiancia es:

$$\frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} |A(w)|^2 dw \quad (26)$$

La densidad espectral de potencia está dada por:

$$P(w) = |A(w)|^2 \quad (27)$$

La función de autocorrelación se puede definir como:

$$\gamma(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} A(t + \tau)A^*(t) dt = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} A^*(w)A(w)e^{\{-i w \tau\}} dw \quad (28)$$

También podemos calcular la autocorrelación a partir de la repartición de irradiancia, esto es:

$$\gamma(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle_{xy}}{\langle I(t) \rangle_{xy}^2} \quad (29)$$

La autocorrelación permite conocer los tamaños de los granos y, a partir de su densidad espectral, la ocurrencia de estos tamaños.

2.2.3.2. Coeficiente de correlación

A partir de la función de autocorrelación, también se puede definir un coeficiente de correlación. Este coeficiente corresponde a una medida numérica del grado de similitud del patrón de speckle consigo mismo en un momento (o región) diferente y, en términos generales, se puede definir como [24]:

$$\mu_{t_0 t} = \frac{\sum_{j=1}^N (I_{(t_0,j)} - \langle I_{(t_0,j)} \rangle) (I_{(t,j)} - \langle I_{(t,j)} \rangle)}{\sqrt{\sum_{j=1}^N (I_{(t_0,j)} - \langle I_{(t_0,j)} \rangle)^2 \sum_{j=1}^N (I_{(t,j)} - \langle I_{(t,j)} \rangle)^2}} \quad (30)$$

Donde N corresponde al número total de valores de intensidad y t a los instantes de muestreo. Un espécimen con un bajo nivel de actividad tiende a mostrar poca variación en el patrón distribuido

en el tiempo (o variaciones más lentas), mientras que aquellos más activos muestran grandes variaciones en las intensidades de los patrones de speckle resultantes. Esto implica una caída pronunciada del valor del coeficiente de correlación en la medida que aumente la dinámica o actividad de la muestra, convirtiendo este coeficiente en un descriptor de actividad en la muestra.

2.2.4. Conexión entre estadísticas espaciales y temporales

La relación entre el tiempo de integración y el contraste del speckle es extremadamente compleja y su tratamiento detallado no forma parte del alcance de esta disertación. Sin embargo, es posible establecer una conexión entre el estadístico espacial de primer orden y el estadístico temporal de segundo orden del grano óptico, permitiendo, mediante el análisis del contraste espacial, obtener información sobre las variaciones temporales de las intensidades. Según Goodman, la varianza espacial de las intensidades es igual al valor medio de la auto covarianza de sus fluctuaciones temporales:

$$\sigma_s^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T C_t(\tau) d\tau \quad (31)$$

Donde T es el tiempo de integración del dispositivo y $C_t(\tau)$ es la autocovarianza central de las fluctuaciones temporales de la intensidad:

$$C_t(\tau) = \langle \{I(t) - \langle I \rangle\} \{I(t + \tau) - \langle I \rangle\} \rangle_t \quad (32)$$

El término del lado izquierdo de la ecuación representa la estadística espacial de primer orden, mientras que su lado derecho representa la estadística temporal de segundo orden [15].

2.2.5. Metrología speckle

La metrología óptica es la rama de la óptica que tiene como propósito efectuar medidas de muy alta precisión usando las ondas de la luz como escala.

Con el estudio de las propiedades estadísticas del speckle se desarrollaron muchas aplicaciones que utilizaban este patrón en técnicas de medición, en particular aquellas empleadas en ensayos no destructivos [14]. Esto permitió el surgimiento de la metrología speckle, esta se puede definir como la rama de la óptica en la que el fenómeno de speckle es utilizado para determinar y cuantificar desplazamientos, deformaciones y velocidades de objetos difusores, variaciones o gradientes de índice de refracción de un medio, etc. Comprende una cantidad relativamente extensa de técnicas, las cuales generalmente resultan incluidas en una de las dos categorías siguientes: a) Fotografía speckle y b) Interferometría speckle.

La implementación de las técnicas básicas de holografía interferométrica utilizando un sistema de video en vez del procesamiento fotográfico y el procesamiento en forma electrónica las señales adquiridas ópticamente por dicho sistema de video surgieron en los años 70 [14]. Éstos trabajos buscaban crear sistemas cada vez rápidos (capaces de funcionar en régimen continuo o próximo a él) de análisis para la inspección de piezas "en línea", mientras éstas eran fabricadas.

La técnica resultante, que incluía un haz de referencia fijo, proveía así la sensibilidad interferométrica de la holografía, surgiendo entonces de la fusión y evolución de la interferometría speckle y la holografía interferométrica que fue denominada Interferometría de Patrón de Speckle Electrónico (*Electronic Speckle Pattern Interferometry* = ESPI, en el idioma original). Técnica que hoy se usa en diferentes aplicaciones tanto industriales como médicas, biológicas, etc [14].

CAPITULO III

TÉCNICAS DE ANÁLISIS DEL BIOSPECKLE

3.1. Biospeckle

Un patrón de speckle se crea a partir de la luz dispersada por partículas en movimiento, estos son modulados por los estados de movimiento de los dispersores. Esto hace que el patrón de speckle varíe en el tiempo y por lo tanto los speckles se llaman temporales. Si los speckles se originan a partir de muestras biológicas, estos reciben el nombre de biospeckles. En el momento en que la luz interactúa con la muestra biológica, esta se esparce en múltiples direcciones. En consecuencia, no es posible reconocer y estudiar cada partícula que dispersa la luz. Los tejidos biológicos poseen como unidad elemental la célula, la cual está constituida en gran medida por agua y compuestos orgánicos. Para la técnica de biospeckle, las características más importantes con respecto a las dimensiones de los organelos celulares, son su índice de refracción y sus propiedades de absorción, así también el orden de magnitud del movimiento celular. Las dimensiones de estas estructuras celulares van desde algunas decenas de nm hasta algunos micrones, siendo así, tendrían cabida los regímenes de esparcimiento Mie o geométrico, para la longitud de onda que utilizamos en este trabajo (632 nm). Una célula por si sola puede actuar como centro de esparcimiento de la luz, y el régimen de esparcimiento a considerar sería el geométrico [15]. En el caso de los vegetales los principales centros de esparcimiento son los cloroplastos, que tienen un tamaño aproximado de 7 μm [15]. Con respecto a la velocidad de los elementos dispersores, esta depende del metabolismo, por ejemplo, en el caso de las plantas, el aislamiento, la cantidad de nutrientes en el suelo, la humedad relativa del aire, el estado del clima, otros, todos ellos son factores que afectan completamente el flujo en las hojas [15].

3.2. Técnicas de análisis del biospeckle

Cada punto de una imagen del speckle, es la superposición de luz esparcida de los múltiples puntos dispersores de la muestra; luego la intensidad resultante es:

$$A(P, t) = \sum_{j=1}^N |A_j(P, t)| e^{i\phi_j(P, t)} \quad (33)$$

Donde A es la amplitud de fase, P el punto de observación, N el número de dispersores que contribuyen a en P y ϕ_j es la fase de cada dispersor [16].

En 1960, se llevaron a cabo varios estudios para definir el speckle dinámico y determinar su estadística. Con este fin, Langmuir y Anisimov introdujeron la función de correlación cruzada. Posteriormente, Briers fue responsable de importantes desarrollos en la estadística temporal de primer orden y en el estudio de la dependencia de las fluctuaciones de intensidades en la longitud de onda usada en la iluminación. En la década siguiente, algunas aplicaciones ya se mostraron especialmente vinculadas a la velocimetría de partículas y, en la década de 1980, se popularizó el interés en su uso en sistemas biológicos [15].

Las técnicas de análisis del biospeckle también reciben el nombre de descriptores, esto debido a que estas técnicas nos entregan una descripción del comportamiento de la actividad del biospeckle en el tiempo. En este trabajo, se utilizaron los descriptores THSP, MCO, correlación, homogeneidad, MI y SMA definidos a continuación [36-45].

3.2.1. Historia temporal de patrones speckle (THSP)

El biospeckle se caracteriza principalmente por fluctuaciones temporales en las intensidades. Una forma de llevar a cabo el monitoreo de estos, consiste en levantar una gráfica de intensidad en un

punto del plano de observación a lo largo del tiempo. En este sentido, se estableció un método para visualizar la evolución temporal de los patrones de speckle observados en el plano de Fraunhofer (lejano), y que al mismo tiempo conserva la información espacial, éste fue descrito por Oulamara et al. De acuerdo con este método, un registro de la historia temporal se realiza en una imagen bidimensional llamada historia temporal del patrón speckle THSP (*Time History Speckle Pattern*, por sus siglas en inglés). Esta imagen consiste en grabar una fila de píxeles en momentos sucesivos y posteriormente en una sola imagen. De esta manera, la primera línea de THSP corresponde a la línea registrada en el primer momento. La segunda línea corresponde al mismo rango de píxeles registrado en el segundo instante y así sucesivamente hasta componer una nueva imagen en la que se registra la evolución temporal de una fila de speckle. En esta matriz $THSP(p,q)$, una de las direcciones corresponde a la evolución temporal de las intensidades del speckle y la otra dirección es la respectiva distribución espacial de la intensidad. En este trabajo la dirección p corresponde a la evolución temporal y q a la distribución espacial.

La figura 7 ilustra el proceso de construcción de la THSP. La matriz de THSP se compone de cada patrón de speckle redimensionado en formato de vector y organizados como columnas consecutivas en la nueva matriz THSP.

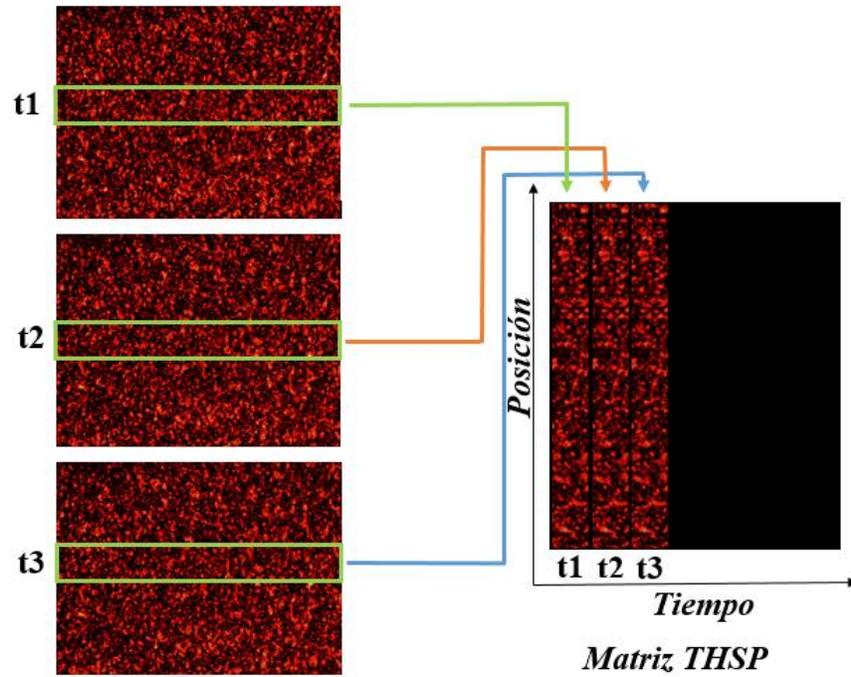


Fig. 7. Formación de la matriz de THSP

La Figura 8 es el resultado de dos matrices THSP, la imagen a) corresponde a patrones speckle dinámicos y b) corresponde a patrones speckle estáticos.

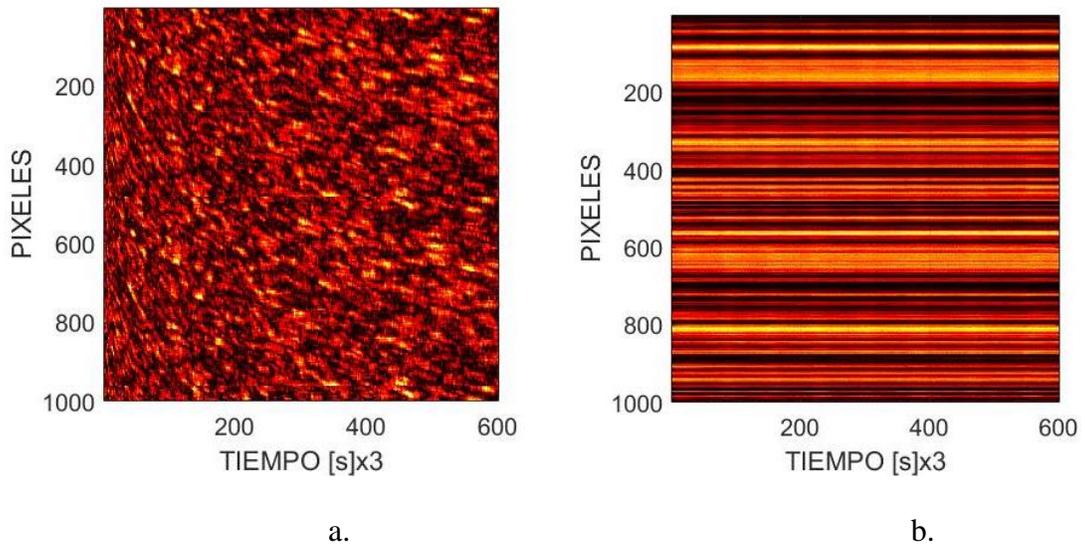


Fig. 8. Matriz THSP del speckle a. estático y b. dinámico.

Entonces, la observación de la THSP permite un análisis cualitativo de la evolución temporal de la superficie. Sin embargo, en la mayoría de las situaciones prácticas, se necesitan valores cuantitativos y para eso es necesario utilizar los otros descriptores estadísticos.

3.2.2. Descriptor autocorrelación y espectro de potencia

La función de autocorrelación es uno de los métodos más tradicionales para evaluar la actividad del biospeckle. El procedimiento de análisis consiste en la evaluación de la autocorrelación espacio-tiempo de las líneas de la THSP y el algoritmo del cálculo se basa en la siguiente relación:

$$\gamma(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle_{xy}}{\langle I(t) \rangle_{xy}^2} \quad (34)$$

Esta relación corresponde a la función de correlación ($\gamma(\tau)$) en términos de valores de intensidad y normalizada.

Aquí se introduce la longitud de correlación eficaz T_c , que es el tiempo para el cual la función autocorrelación normalizada tarda para llegar al valor de $\frac{1}{\sqrt{2}}$. El criterio de “valor eficaz” se usa a menudo en varias ramas de la ingeniería, especialmente en sistemas electro-electrónicos. Usamos este valor como una estimación de la longitud de correlación. Por lo tanto, cuanto mayor es el valor de T_c , mayor es la longitud de correlación y, por lo tanto, las variaciones en las intensidades son más lentas. Del mismo modo, una menor longitud de correlación, representa variaciones más rápidas y una mayor actividad en las intensidades [15].

En el espectro de potencia, las frecuencias más altas corresponden a velocidades más altas. La potencia promedio y la frecuencia promedio son dos parámetros habituales en el espectro de uso de las intensidades. La frecuencia promedio se puede asociar, con aproximación relativa, al movimiento de los separadores sobre una longitud de onda y proporciona una estimación

aproximada de la velocidad promedio de las partículas en el tejido. Otros criterios utilizados para caracterizar la función de autocorrelación son los tiempos demandados para que su valor máximo disminuya al 50% o $1/e$ [46].

3.2.3. Matrices de coocurrencias o comatriz y descriptor momento de inercia

El método de la matriz de coocurrencia, desarrollado por Arizaga et al, está basado en una técnica del mismo nombre ampliamente utilizada en análisis de textura en procesamiento de imágenes digitales.

La matriz de coocurrencia (MCO) se calcula en el THSP, y se define como:

$$MCO = [N_{ij}] \quad (35)$$

El valor de N_{ij} corresponde al número de veces que el valor de intensidad i es inmediatamente seguido por el valor de intensidad j en la dirección y sentido de la evolución temporal. El orden de la matriz MCO es equivalente al número de tonos del sistema de adquisición utilizado. Cuando la superficie de propagación es estática, es decir, el THSP prácticamente no tiene variaciones de intensidad en el tiempo, por ejemplo, solo la diagonal principal contiene valores de ocurrencia distintos de cero. Cuando la THSP presenta gran actividad, los elementos no nulos se distribuyen alrededor de la diagonal principal. Cuanto más activa sea la muestra, más dispersa alrededor de la diagonal se distribuyen los puntos y viceversa.

A continuación, se muestran dos ejemplos desarrollados en este trabajo. Para el ejemplo estático se toma una matriz 4x4 de THSP simulada, que representa un patrón de speckle estático en el que se puede observar que la intensidad que corresponde a los valores ubicados verticalmente, no tiene variación en el tiempo que en este caso está medido de manera horizontal. Cuando se aplica la

matriz de coocurrencia a esta THSP se observa que solo tiene valores en la diagonal, lo que quiere indicar que, al no haber actividad en el speckle, no se ve esparcimiento alrededor de la diagonal. En el ejemplo dinámico, se toma igualmente una matriz 4x4 de THSP simulada, que esta vez representa un patrón de speckle dinámico en el que se puede observar que los valores de intensidad son diferentes a medida que transcurre el tiempo. Cuando se aplica la matriz de coocurrencia en esta THSP se observa que hay esparcimiento en los valores diferentes de cero, alrededor de la diagonal.

- Ejemplo de la formación de la matriz de coocurrencia a partir de la THSP para el speckle estático y dinámico.

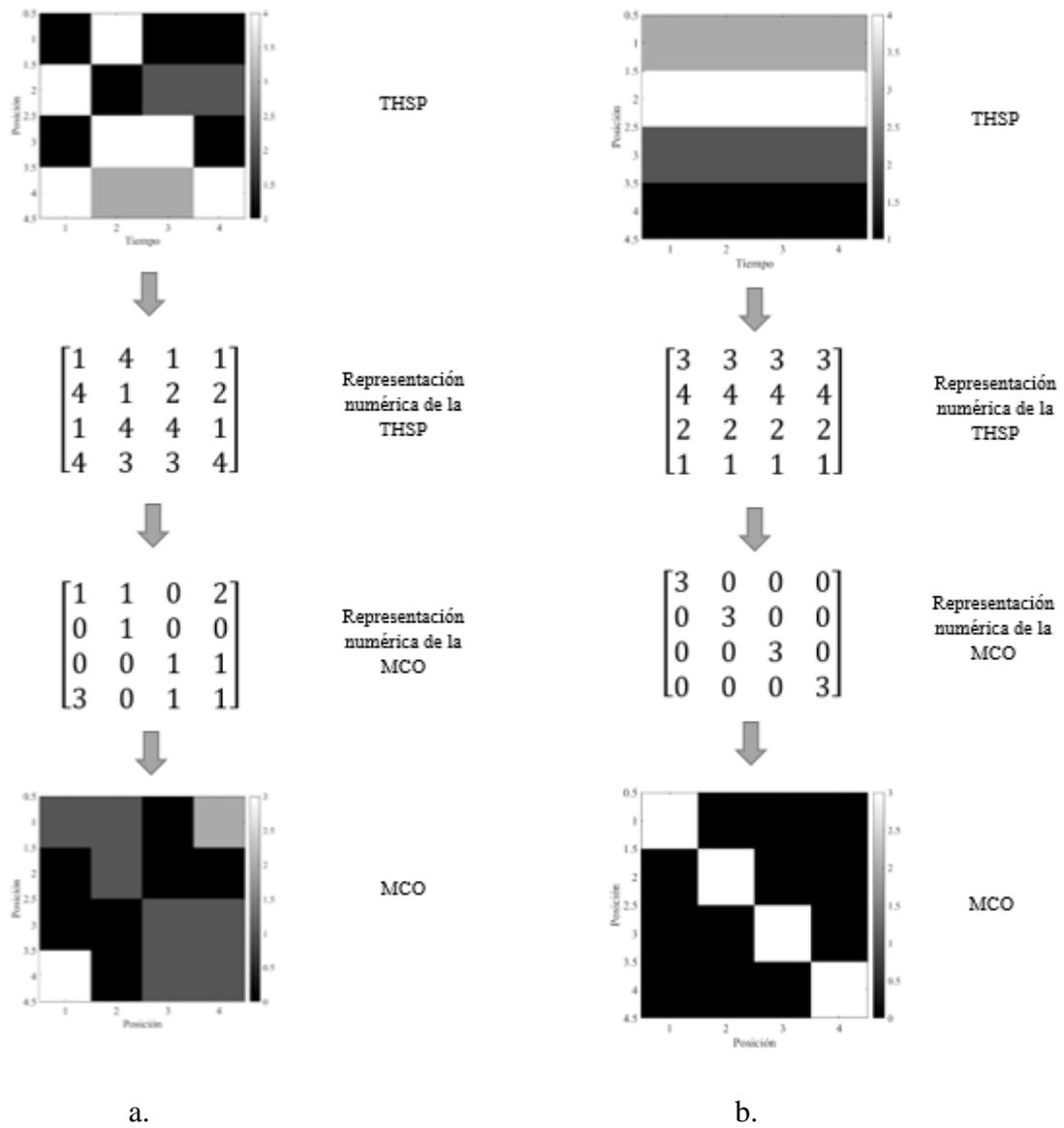


Fig. 9. Ejemplo representativo del cálculo de la MCO de la THSP a. dinámico y b. estático

En la siguiente figura 10 podemos observar las matrices de THSP que representan patrones de speckle, en diferentes momentos de actividad biológica, de las muestras analizadas en este trabajo; al frente de cada THSP tenemos la representación de su respectiva MCO.

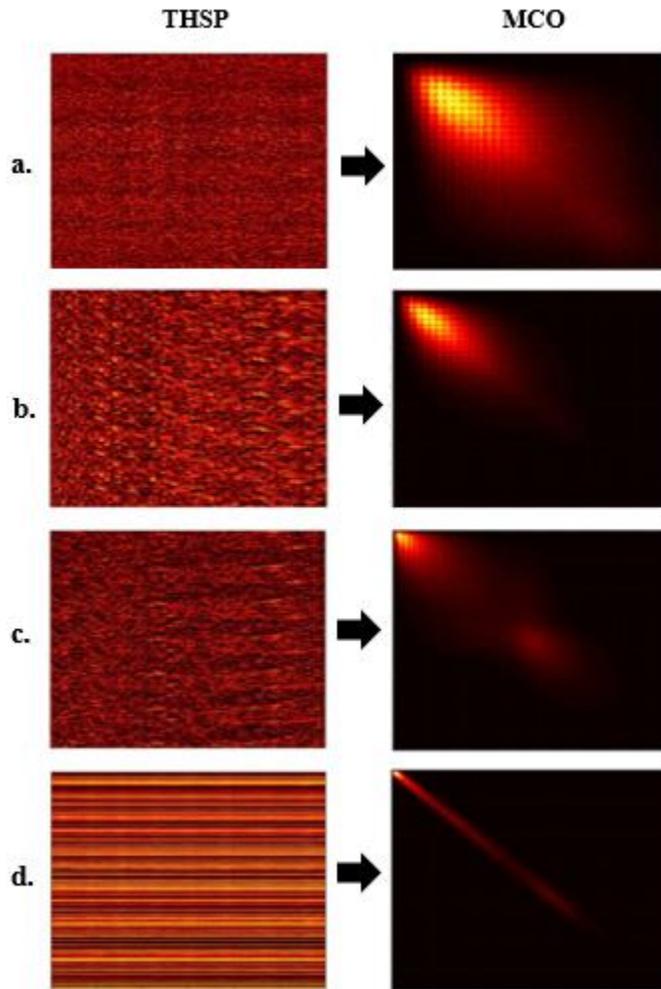


Fig. 10. THSP y sus respectivas matrices de coocurrencia para diferentes fases de actividad del speckle organizadas desde la a. con mayor speckle dinámica, hasta la d. con menor speckle dinámico.

Una forma de cuantificar la medida de la dispersión de los puntos alrededor de la diagonal es calculando el momento de inercia:

$$MI = \sum_{ij} P_{ij}(i - j)^2 \quad (36)$$

La forma asumida por el índice calculado tiene analogía con el momento de inercia conocido en mecánica. Este índice también se llama el momento de intensidades.

3.2.4. Histograma

Un histograma es la frecuencia con que un determinado valor de intensidad aparece en una imagen.

3.2.5. Energía o descriptor segundo momento angular

El segundo momento angular también se conoce como uniformidad o energía. Es la suma de los cuadrados de las entradas en la MCO (comatriz).

El segundo momento angular mide la homogeneidad local de la imagen y es alto cuando la imagen tiene muy buena homogeneidad o cuando los píxeles son muy similares.

La energía o segundo momento angular en una señal digital se calcula como:

$$SMA = \sum_{i,j} P_{i,j}^2 \quad (37)$$

donde P_{ij} es la probabilidad de coocurrencia de los valores de gris i y j , para una distancia dada.

3.2.6. Descriptor Homogeneidad

Una imagen resulta homogénea si los valores de la diagonal principal de la matriz de coocurrencia son altos, esto porque al observar la ecuación de homogeneidad los valores de probabilidad en la matriz son mayores en la diagonal principal y su peso decae exponencialmente al alejarse de la diagonal.

$$Homogeneidad = \sum_{i,j=0}^{N-1} \frac{P_{i,j}}{1+(i-j)^2} \quad (38)$$

Una imagen se dirá homogénea si todos los píxeles tienen el mismo valor. Si esto ocurre la matriz de coocurrencia tendrá un solo valor igual a uno (1) en su diagonal principal y dará como resultado un índice de homogeneidad igual a uno (1), que corresponde al máximo valor que podría tener. El caso contrario es que la imagen tenga todos los valores de píxeles diferentes, entonces se obtendría

una matriz de coocurrencia con valores nulos y el valor del índice de homogeneidad será cero. Se dirá que si los valores son próximos a uno (1) entonces es una imagen suave y los que son cercanos a cero o nulo entonces se dirá que al no tener homogeneidad es una imagen tosca.

3.2.7. Descriptor contraste de Briers

Si el biospeckle resultante en un plano de observación compuesto por una mezcla de dos patrones procedentes de esparcidores estáticos y móviles las intensidades medias están dadas respectivamente por $\langle I_E \rangle$ e $\langle I_M \rangle$. El componente estático no muestra variaciones de tiempo, por lo que los valores instantáneos de las intensidades son iguales a su promedio temporal, es decir:

$$I_E(x, y) = \langle I_E(x, y) \rangle_t \quad (39)$$

El componente dinámico, sin embargo, no exhibe el mismo comportamiento. Esto quiere decir, por ejemplo, que si tenemos una colección de imágenes sucesivas de un patrón dinámico (suponiendo que es posible fotografiar solo el componente móvil), cuando realizamos el promedio de todas estas imágenes el patrón resultante será uniforme. Por otro lado, si tenemos una colección de fotografías de solo el componente estático, la imagen promedio será idéntica a las imágenes de la colección.

Por razones de ergodicidad (igualdad entre el promedio estadístico y el promedio temporal de un proceso aleatorio), considerando que las intensidades del componente móvil varían aleatoriamente y asumen todos los valores posibles a lo largo del tiempo, tenemos:

$$\langle I_M(x, y) \rangle_t = \langle I_M(t) \rangle_{xy} \quad (40)$$

La expresión confirma que se establece una conexión entre los promedios temporales y espaciales del componente dinámico. Esto implica que, a partir del estudio del promedio de las intensidades espaciales en un instante dado, es posible obtener información sobre las intensidades promedio en

el tiempo. Viendo ahora el índice como una relación entre la intensidad promedio del componente móvil y la intensidad total media, tenemos:

$$\rho = \frac{\langle I_M(t) \rangle_{xy}}{\langle I_M(t) \rangle_{xy} + \langle I_E \rangle_{xy}} \quad \text{ó} \quad \frac{\langle \sigma_t^2(x,y) \rangle_{xy}}{\langle I_t \rangle_{xy}^2} = 1 - (1 - \rho)^2 \quad (41)$$

Es decir, suponiendo que los esparcidores estáticos y móviles tienen propiedades de dispersión idéntica y que solo estos dos tipos de estructuras son responsables de la formación del biospeckle registrado, analizando el contraste de una sola imagen instantáneamente, es teóricamente posible establecer la proporción entre los centros móviles y estáticos. El lado izquierdo de la ecuación anterior se conoce como contraste de Briers, debido al nombre del autor que lo dedujo. En la práctica, sin embargo, es muy difícil comprobar si este índice de actividad es válido, ya que no es posible conocer con precisión, por otros métodos, las proporciones de partículas estáticas y móviles en un tejido biológico, lo que permitiría hacer una comparación [15].

3.2.8. Descriptores de Fujii y diferencias generalizadas

El método de Fujii se basa en el cálculo de la visibilidad entre los píxeles de la imagen registrados con el tiempo. Matemáticamente, el procedimiento para construir el mapa de Fujii está descrito por:

$$I(x, y) = \sum_{k=1}^{N-1} \left| \frac{I_{k+1}(x,y) - I_k(x,y)}{I_{k+1}(x,y) + I_k(x,y)} \right| \quad (42)$$

Donde N corresponde al número total de imágenes grabadas e $I_k(x, y)$, el valor de intensidad en posición (x, y) en la imagen k . De la ecuación anterior se construye una nueva imagen. Por lo tanto, los píxeles de las regiones donde no ha habido cambios en la intensidad con el tiempo, no asumen ningún valor en el mapa final, mientras que las áreas donde los píxeles han sufrido cambios

importantes adquieren valores más altos. De esta manera, la imagen resultante presenta puntos claros en áreas de gran actividad y manchas oscuras en aquellos con baja actividad. El método de las diferencias generalizadas (DG) es una versión más simple del método Fujii. En esta técnica, se construye un mapa de actividad a partir de diferencias entre los píxeles de las imágenes grabadas durante el monitoreo. La ecuación que describe que el método DG viene dado por:

$$I(x, y) = \sum_k \sum_l |I_{k+l}(x, y) - I_k(x, y)| \quad (43)$$

De la misma manera que se describe en la metodología anterior, con las diferencias generalizadas las zonas de menor actividad aparecen más oscuras en relación con aquellas en las que las variaciones de intensidad fueron mayores con el tiempo. Sin embargo, una distinción significativa entre este método y el de Fujii radica en su mayor sensibilidad a las situaciones en la intensidad de la fuente. Por ejemplo, si entre una imagen y otra el láser se vuelve más intenso, la región inactiva se mostrará en un tono más claro en el mapa final [15].

3.2.9. Descriptor LASCA (*Laser Speckle Contrast Analysis*)

LASCA se basa en calcular el contraste de un objeto iluminado con luz láser. Debido al tiempo de integración finito del dispositivo que se utilice para la captura de la imagen de speckle dinámico, esta presenta pérdida de contraste. A mayor actividad presente en la muestra, menor será el contraste de la imagen speckle.

La idea básica del método LASCA consiste en dividir la imagen speckle en celdas cuadradas y calcular el contraste de cada celda. Estos valores de contraste se asignan a los píxeles centrales de las celdas correspondientes y se construye una nueva imagen, formando un mapa de contrastes. En regiones de mayor actividad de la muestra, el valor de contraste es más bajo y estas zonas aparecen

más oscuras en el mapa. En zonas de menor actividad el contraste es mayor, y en la imagen mapa, estas zonas se ven con mayor claridad.

La gran ventaja de LASCA radica en el hecho de que requiere, solo una imagen speckle, tomada durante el tiempo de integración del dispositivo de registro.

La desventaja del método LASCA es la pérdida de resolución espacial. Otra desventaja de LASCA es la contaminación del mapa por ruido espacial. El biospeckle está compuesto de una mezcla de un patrón estático y uno dinámico. Para evaluación de la actividad solo interesa el componente dinámico; sin embargo, en la imagen LASCA los valores del contraste del componente estático también influye en el contraste final.

3.2.10. Descriptor LASTCA (*Laser Speckle Temporal Contrast Analysis*)

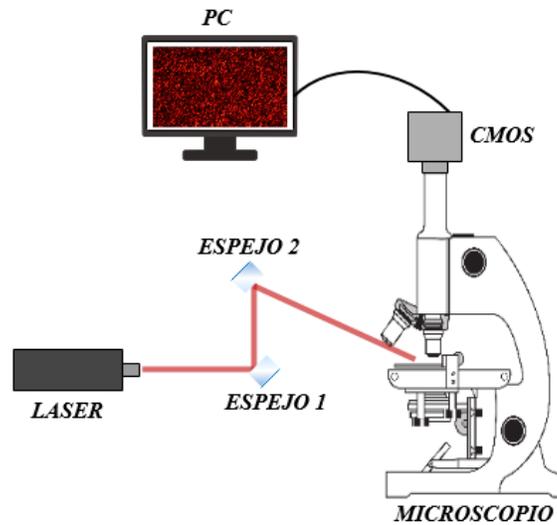
El método LASTCA, o análisis de contraste temporal, consiste en la construcción de un mapa calculando el contraste temporal de las intensidades de cada píxel. El valor de cada píxel en el mapa se obtiene en base a la ecuación que representa el contraste del speckle:

$$I(x, y) = \frac{\sigma_{xy}}{\langle I_{xy} \rangle} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N-1} \{ \sum_{n=1}^N [I_{xy}(n) - \langle I_{xy} \rangle]^2 \}}}{\langle I_{xy} \rangle} \quad (44)$$

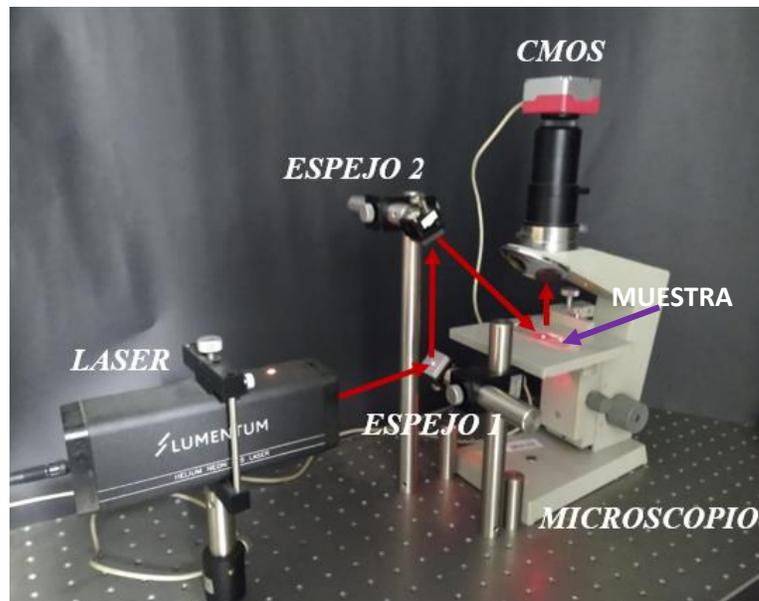
La ventaja de este descriptor sobre el LASCA radica en su inmunidad a ruido causado por contraste espacial, los valores de intensidad en el mapa final solo dependen de la intensidad de cada píxel en el tiempo, por lo tanto, el contraste espacial no se calcula en la imagen final. Sin embargo, la desventaja de este método es la necesidad de una colección de imágenes, lo que dificulta las pruebas en animales vivos o humanos. Sin embargo, en general, el número de imágenes requeridas es del orden de docenas, lo que hace que esta técnica sea ventajosa en comparación con el método Fujii o DG [15].

CAPITULO IV

METODOLOGÍA Y RESULTADOS



- a) Esquema del montaje experimental para la captura del biospeckle; modo de trabajo subjetivo. Los objetivos de microscopio se quitan para trabajo en modo speckle objetivo.



- b) Fotografía del montaje experimental para la captura del biospeckle; modo de trabajo objetivo.

Fig. 11. Esquema experimental utilizado en el registro de imágenes speckle de muestras biológicas estudiadas.

El esquema experimental (figura 11) consta de un láser He-Ne (632 nm) y potencia 5μW, dos espejos planos, una estructura de microscopio, una cámara CMOS (Moticam 2500) y un computador. El haz láser sin expandir, incide en el espejo 1 después se refleja 90° hacía el espejo 2, dispuesto de movimiento fino para que el operario pueda ajustar la iluminación sobre la muestra, de tal forma que la luz esparcida de ella llegue directamente al sensor de la cámara CMOS (con o sin lente objetivo), así se obtienen las imágenes de biospeckle. La CMOS utilizada es una Moticam 2500, tiene una resolución de 2592x1944 pixeles; cada pixel tiene un tamaño de 2.2 μm x 2.2μm y un área de imagen de 5.70mm x 4.28mm. La captura de imágenes se realizó utilizando el software Motic Images Plus 2.0, y su procesamiento se llevó a cabo mediante un software desarrollado en lenguaje Matlab/R2014a. El procesamiento implementado en Matlab está referido al cálculo de los siguientes descriptores: matriz THSP, histograma, momento de inercia, segundo momento angular, autocorrelación y homogeneidad. Adicionalmente, el software desarrollado permite calcular la evolución temporal y la curva de ajuste de los descriptores momento de inercia, segundo momento angular, autocorrelación y homogeneidad, y a partir de estas curvas de ajuste el tiempo medio.

Utilizar la estructura del microscopio, hace de este arreglo versátil para su uso en aplicaciones que requieran trabajar con speckle objetivo y subjetivo. Para este trabajo de investigación se trabajó en modo speckle objetivo, de tamaño medio de grano de speckle $\approx 45.14 \mu$; este tamaño se estimó mediante la siguiente relación:

$$d_{sp} = \frac{\lambda z}{\Phi} = \frac{(0.632 \mu)(2 \times 10^5 \mu)}{(2800 \mu)} = 45.14 \mu$$

4.1. Muestras vegetales

Las imágenes en la figura 12 corresponde a la materia prima de los tipos de muestras utilizadas en esta investigación; estas plantas están ubicadas en el campus principal de la Universidad de Pamplona.

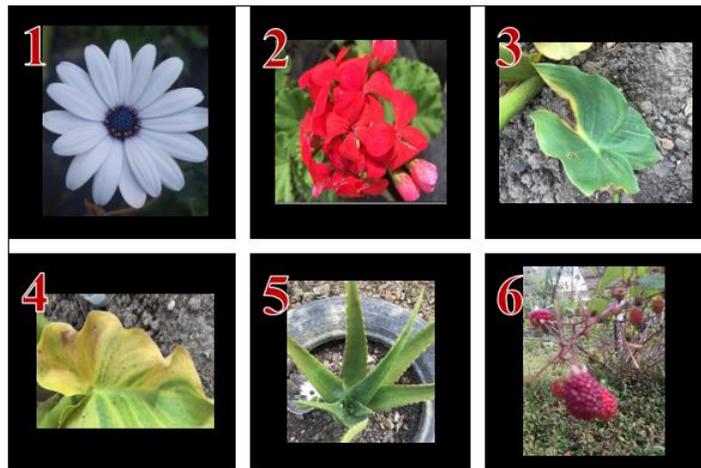


Fig. 12. Fotografías de las muestras objetos de prueba para el análisis de biospeckle.

Descripción de las muestras:

- **Muestra 1**

La majestuosa Margarita del Cabo, *Dimorphotheca ecklonis* (sin. *Osteospermum ecklonis*) es una especie herbácea perenne o sub-arbustiva de la familia Asteraceae muy cultivada en jardines de todo el mundo por su abundante y hermosa floración. Es una planta originaria del continente africano (Sudáfrica) pero su alto valor ornamental ha permitido su cultivo en regiones tropicales y templadas de todo el mundo [18].

- **Muestra 2**

Geranio o novio, su nombre científico es *Geranium* spp. *Prlargonium* spp. Es de la clase angiospermae y subclase dycotiledoneae. Posee tallos largos, que pueden ser sarmentosos o no. En las hojas, los novios llevan el dibujo de una especie de herradura parda rojiza. Las hojas pueden ser glabras o pubescentes,

bordeadas de blanco o amarillo. La inflorescencia puede ser solitaria o en racimo, con flores blancas, rosadas, rojas granates o de color salmón [19].

- **Muestra 3 y 4**

Zantedeschia aethiopica, conocida comúnmente como alcatraz, cala, cala de Etiopía, aro de Etiopía, lirio de agua, cartucho, flor de pato o flor del jarro, es una planta perenne herbácea de origen sudafricano, de la familia de las aráceas, la más robusta y ampliamente naturalizada del género *Zantedeschia*. Produce numerosas hojas de color verde brillante basales, sagitadas y largamente pecioladas. Las inflorescencias erectas se llaman espádices, pueden medir de 4 a 18cm de largo y están envueltas por una espata (bráctea modificada) blanca de forma acampanada. En las variedades pueden ser de diversos colores. Es monoica, por lo que las diminutas flores de ambos sexos se encuentran en la misma planta; en cada espata las femeninas se sitúan bajo las masculinas, que forman las anteras amarillas. Es la flor nacional de Etiopía. Las muestras 3 y 4 pertenecen a la misma especie, pero están en diferente momento de vida, la muestra 3 está verde y recién cortada, mientras que la muestra 4 es una hoja que empezaba a marchitarse [20].

- **Muestra 5**

Aloe vera, llamado sábila, acíbar o áloe de Barbados, entre otros, es una especie suculenta de la familia *Asphodelaceae*. Con unas quinientas especies, el aloe está ampliamente distribuido y se considera una especie invasora en muchas regiones del mundo. Es una planta de hoja perenne, probablemente se originó en la Península Arábiga, pero crece de forma silvestre en climas tropicales, semitropicales y áridos de todo el mundo. Se cultiva para productos comerciales, principalmente como tratamiento tópico utilizado durante siglos. La especie es atractiva con fines decorativos y tiene éxito en interiores como planta de maceta [21].

- **Muestra 6**

La mora (*Rubus ulmifolius*) es el nombre común que recibe una especie de arbusto que pertenece a la familia de las rosáceas. También es conocido como la zarza o la zarzamora y es especialmente popular por los frutos que produce [22].

4.2. Preparación de las muestras para el arreglo de biospeckle (fig.11)

En la recolección de las muestras 1 y 2 se cortaron pétalos de las flores, y para las pruebas de biospeckle se hicieron cortes de área 2 cm x 1.3 cm, y de espesor 0.15 mm, aproximadamente. Las muestras 3 y 4 corresponde a las hojas, se hicieron cortes de 1.5 cm x 1.5 cm, y de espesor 0.3 mm, aproximadamente. Por último, de las muestras 5 y 6 se tomó una sección delgada de aproximadamente 0.5 mm de espesor y de área 1.5 cm x 1.5 cm.

4.3. Espectro de absorbancia de las muestras

El interés de esta caracterización fue determinar la profundidad de penetración de la luz láser (HeNe- 632nm) utilizada en este trabajo, esto para cada una de las seis muestras de prueba. Es conocido que, en el caso de las plantas, la clorofila es la responsable de esta actuación sobre la luz.

Para esta caracterización, se obtuvo una solución líquida de cada muestra vegetal descrita en el apartado anterior. Para cada tipo de muestra, se recolectó una cantidad de material vegetal suficiente para obtener 2.5 ml de jugo libre de pulpa; este volumen de muestra líquida se obtuvo mediante macerado en un mortero y pasado por un filtro tela; luego se adicionó agua pura hasta obtener la transparencia óptica adecuada para la cubeta portamuestras (10 mm de espesor óptico) del espectrómetro PASCO PS-2600, el cual funciona por transmisión; este tiene una resolución de 2 nm a 3 nm, una banda espectral de detección de 390 nm a 950 nm y una fuente de luz es de tungsteno potenciado por LED.

En la figura 13 se muestran los espectros de absorbancia obtenidos para las seis muestras. El poder de penetración de la luz en los tejidos depende, entre otros factores, de la capacidad de absorción

de la muestra; en el caso de material biológico se define como ventana terapéutica o ventana óptica, en la que la gran mayoría de los tejidos vivos absorben menos, lo que permite una mayor penetración de la luz. En los seis espectros obtenidos (figura 13) se puede observar el valor de la absorbancia para la longitud de onda de 632 nm, que corresponde a la del láser que se utilizó en el arreglo óptico de biospeckle (figura 11). Los resultados son los esperados, corresponden a la ventana de absorción característica de las plantas. A partir de estos resultados de la figura 13 se estimó la profundidad de penetración para la longitud de onda de 632 nm:

# Muestra	P. P. (mm)
1	6.6
2	4.0
3	6.8
4	4.3
5	36
6	7.0
$P. P. = \ell \log_{10}(e)/A$	

Tabla 1. P.P.: Profundidad de penetración; $\ell=10$ mm: espesor del portamuestras; A: absorbancia; e: número de Euler.

Estos resultados permiten establecer la hipótesis de que, teniendo en cuenta los espesores de muestra utilizados en las pruebas de biospeckle, la movilidad de las estructuras dispersoras de las muestras, posiblemente no obedeció en gran medida a un efecto de la absorción del haz láser utilizado, si tal vez a un efecto de deshidratación natural, ejemplo, por acción térmica ambiental u otros factores internos y externos (que no está al alcance de esta investigación determinarlos), dado que los espesores de las muestras preparadas para esta técnica fueron de 0.15 mm caso muestras 1 y 2, 0.3 mm caso muestras 3 y 4, y 0.5 mm caso muestras 5 y 6; estos espesores están muy por debajo de la P.P. de la luz en cada una de las muestras, siendo así, es evidente que la luz penetró hasta todas las estructuras celulares que generaron las imágenes de speckle.

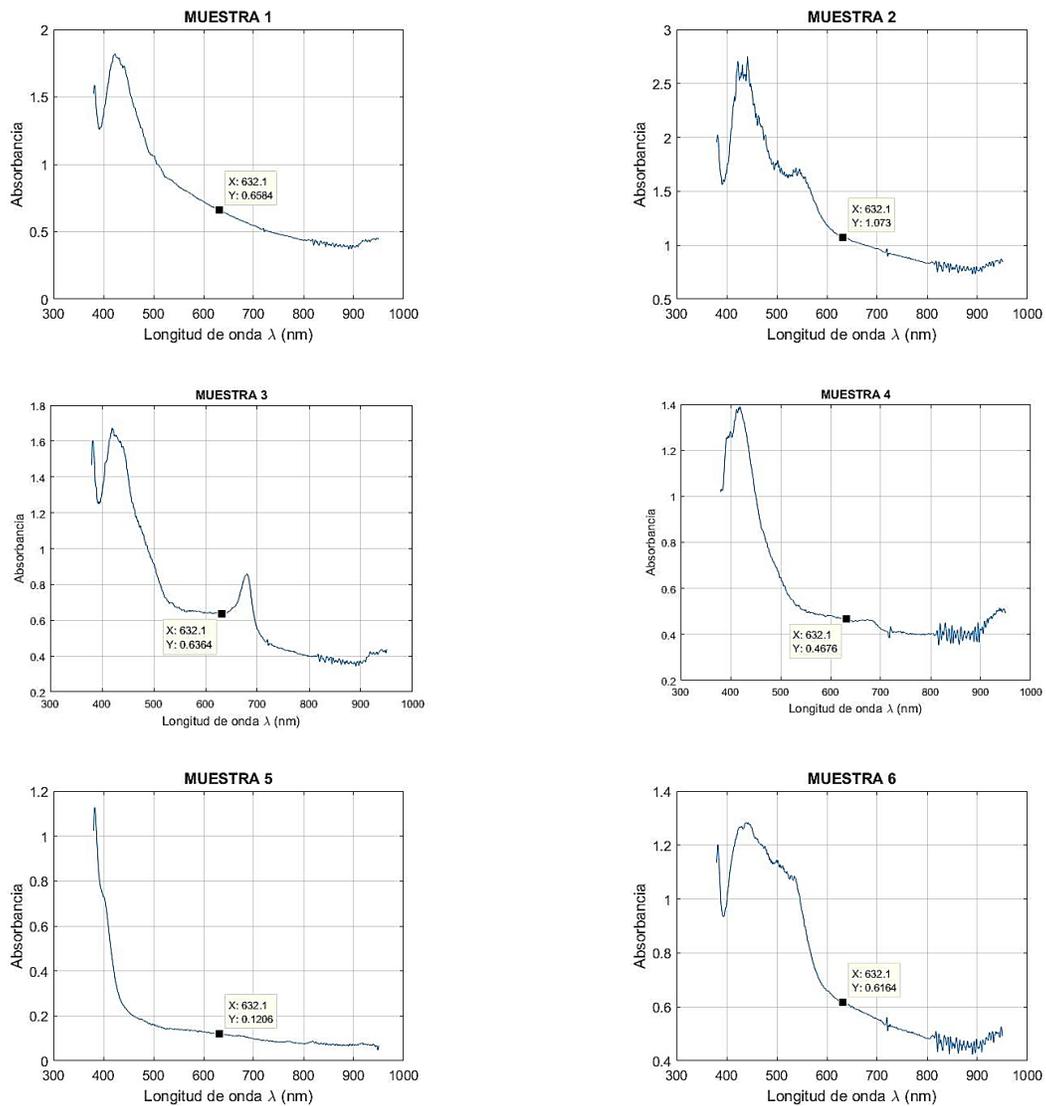


Fig. 13. Espectros de absorbancia de cada muestra, medido con el espectrómetro PASCO.

4.4. Procesamiento y análisis de resultados de biospeckle

Para el procesamiento de las imágenes se desarrolló un programa en MATLAB el cual realiza la siguiente secuencia de flujo de acciones, en su orden:

1. Carga el número N imágenes de biospeckle establecidas por el usuario para ser capturadas mediante el programa Motic Images Plus.

2. Convierte las imágenes a niveles de gris, las redimensiona a formato de vector 1000x1 filas y construye la matriz THSP.
3. Calcula la matriz de coocurrencias MCO mediante la función “*graycomatrix.m*”
4. La función “*graycoprops.m*” carga la matriz MCO y calcula los descriptores momento de inercia, autocorrelación, segundo momento angular y homogeneidad; reporta los cuatro vectores respectivos, en función del tiempo.
5. Calcula la curva de ajuste, para el vector calculado para cada descriptor, usando la función “*polyfit.m*”. La función arroja tres datos, un factor triangular, el número de grados de libertad y la norma de los residuos. El algoritmo se enfoca en el tercer dato, que da información del error con el que se calcula cada polinomio. El error de cada polinomio se va guardando en un vector para luego encontrar el valor mínimo de error y a que polinomio corresponde; tomando este polinomio como la mejor curva de ajuste para el descriptor; luego, se evalúa el polinomio en un vector que describe el tiempo con la función “*polyval.m*”. Por último, el programa encuentra el valor medio del ajuste usando la definición del teorema del valor medio y para hallar su posición en el tiempo, realiza una interpolación con la función *interp1.m* entre el polinomio, el vector que representa el tiempo y el valor medio obtenido.
6. Finalmente, el algoritmo arroja la imagen de la THSP, de la MCO de la THSP, de la MCO para el patrón observado en cuatro instantes de tiempo diferentes, el histograma de la THSP y la curva para cada descriptor con su respectivo ajuste y valor medio.

4.4.1. Prueba de calibración utilizando una muestra de estructura rígida

Se realizó una toma en el tiempo de imágenes de speckle usando como muestra una lámina despulida de aluminio, esto con el fin validar el arreglo experimental en términos de distribución espacial de iluminación sobre la muestra, estabilidad en la intensidad del láser, ruido mecánico, tamaño de grado de speckle, condiciones ambientales, principalmente; se utilizó el aluminio como muestra porque su rigidez garantiza que su comportamiento característico es de dispersores estáticos, bien se puede utilizar otro tipo de material dispersor rígido.

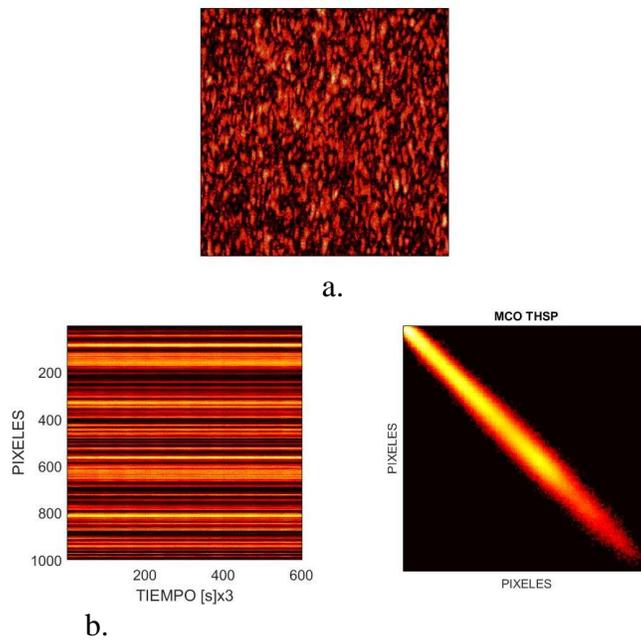


Fig. 14. a. Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, b. Matriz THSP, c. Comatriz de la THSP

En la figura 14.a es el patrón de speckle, en el tiempo $t=100s$, de una secuencia de tomas durante 30 minutos. Las figuras 14.b y 14.c corresponden a la matriz THSP y la MCO, respectivamente. En la THSP se puede observar que se forman trazos horizontales de intensidad constante, esto se traduce en que sobre la misma fila no hay cambios en la intensidad de los pixeles a lo largo del tiempo, es decir que los dispersores se mantuvieron estáticos durante el muestreo de 30 minutos; también en su respectiva MCO se observa una tendencia de distribución diagonal propio de un

estado invariable en el tiempo, en la distribución espacial e intensidad de la imagen de speckle, en otras palabras, los dispersores de la muestra están estáticos.

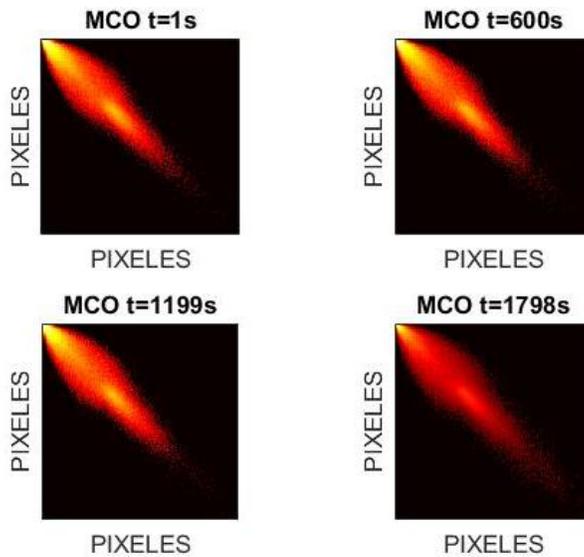


Fig. 15. Comatriz de cada patrón speckle en t=1, 600, 1199, 1798 segundos

En la figura 15. se puede ver el comportamiento de la MCO en diferentes instantes de tiempo. En este caso cada comatriz representa la estadística de distribución de número de repetición de los diferentes valores de intensidad presente en la imagen de speckle. Visualmente, a diferencia de la comatriz de la THSP, es difícil sacar conclusión sobre la movilidad de los dispersores porque en este caso la MCO corresponde a un solo instante de tiempo, sin embargo, su utilidad está en que podemos calcular de ella los valores MI, SMA, Homogeneidad y Correlación para ese instante de tiempo; hecho esto en cada imagen de muestra, se puede levantar la relación temporal de estos cuatro descriptores.

La figura 16 muestra la relación temporal de los descriptores MI, correlación, SMA y homogeneidad, en función del tiempo de muestreo. El comportamiento de estos descriptores es constante, indicador de dispersores estáticos; este resultado concuerda con la predicción de

dispersores estáticos que muestra la MCO de la THSP, en términos de que, la distribución de repetición de valores de intensidad, se ubican sobre o muy cerca de la diagonal.

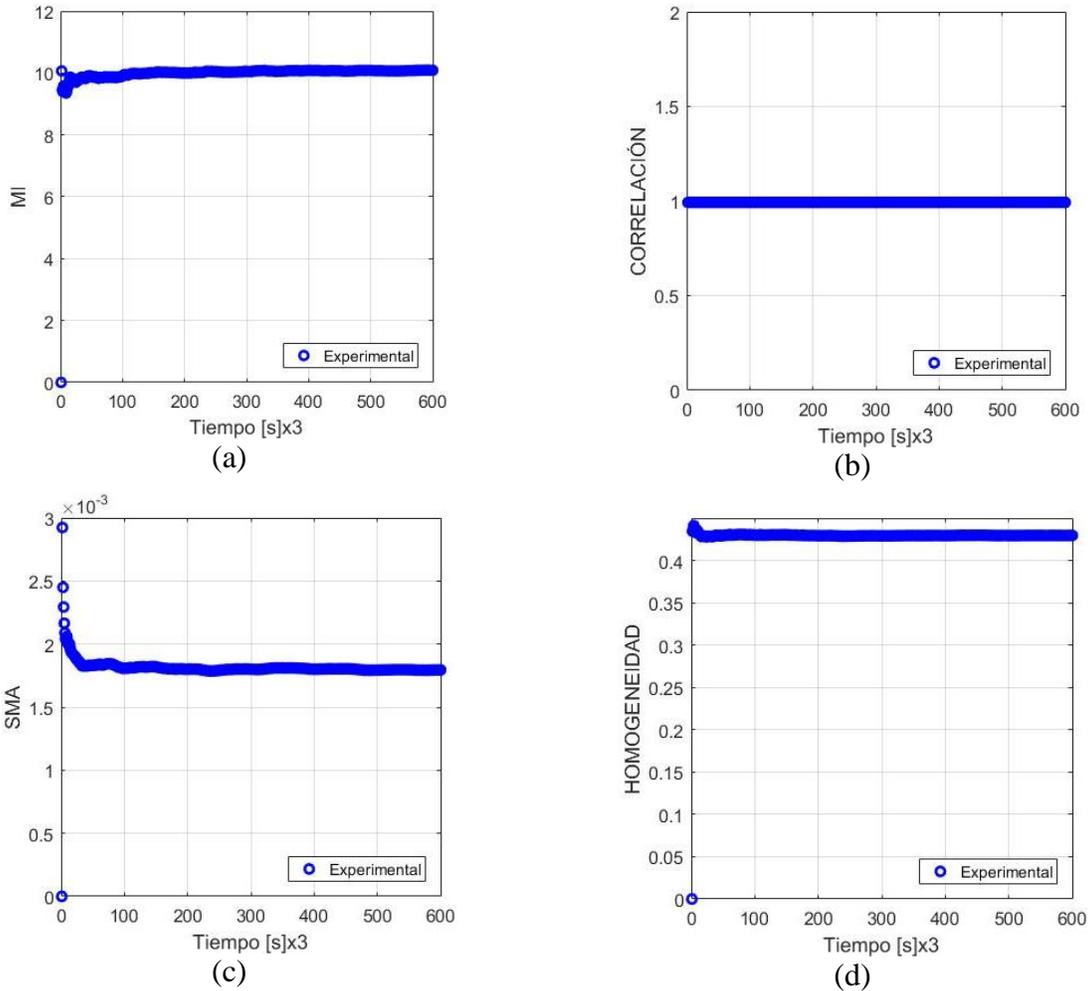


Fig. 16. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

Los siguientes resultados corresponde a pruebas de validación del arreglo experimental utilizando las seis muestras vegetales descritas en el apartado 4.1 y 4.2. Resultados del estilo de los presentados en las figuras 14, 15 y 16 se incluyen a continuación para cada una de las seis muestras vegetales, para las cuales se estimó el tiempo medio de actividad biológica durante 30 minutos de muestreo. Al final de todos los resultados se presenta la discusión y análisis de los mismos. En este caso el muestreo se hizo en condiciones de temperatura y humedad relativa del laboratorio, $\approx 20^\circ\text{C}$ y $\approx 70\% \text{HR}$, respectivamente.

4.4.2. Muestra 1

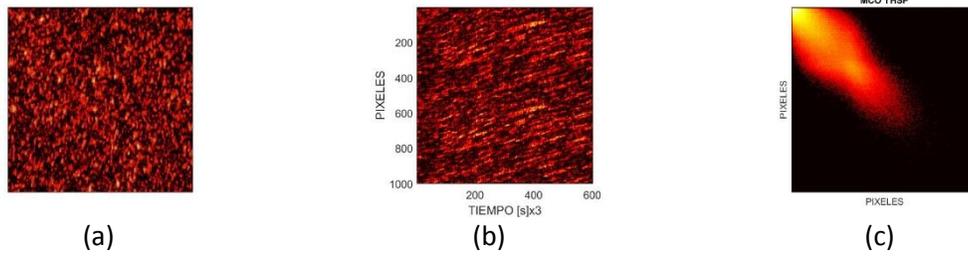


Fig. 17. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP

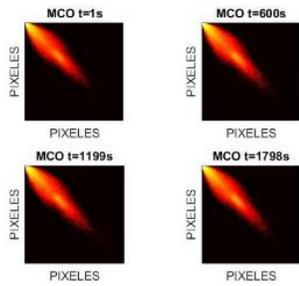
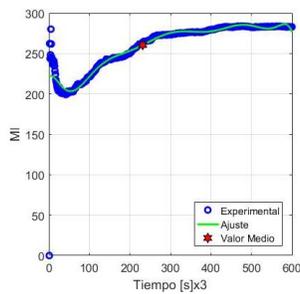


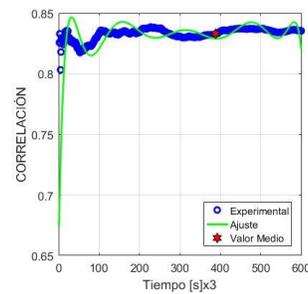
Fig. 18. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos

Tabla 2. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.

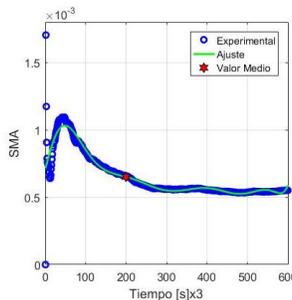
	Valor_Medio	Tiempo_medio_sx3
MI	260.44	231.7
Correlación	0.83299	388.06
SMA	0.00065127	199.89
Homogeneidad	0.18857	208.61



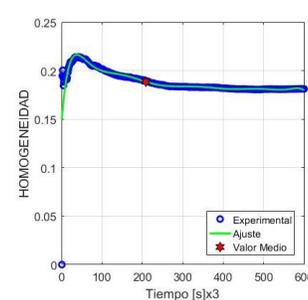
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 19. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

4.4.3. Muestra 2

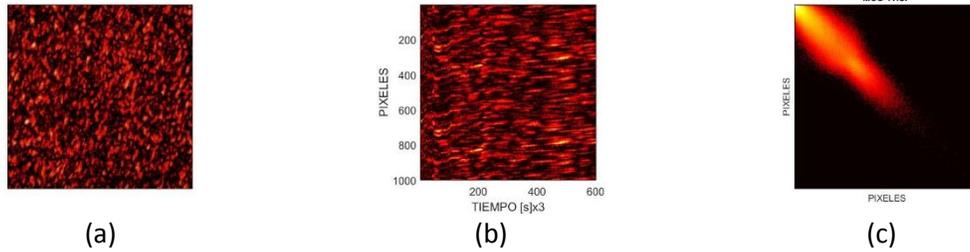


Fig. 20. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP

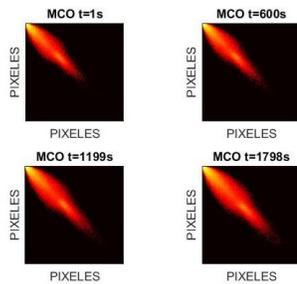
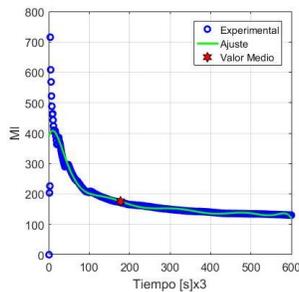


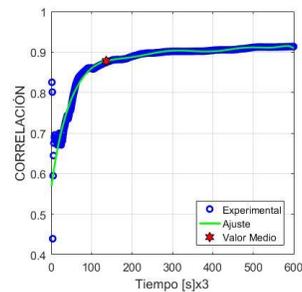
Fig. 21. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos

Tabla 3. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos

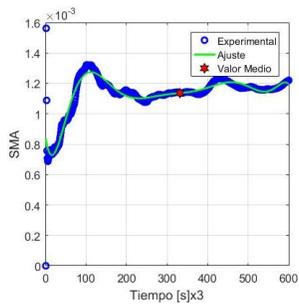
	Valor_Medio	Tiempo_medio_sx3
MI	175.66	177.72
Correlación	0.8779	136.2
SMA	0.0011359	331.59
Homogeneidad	0.22831	129.06



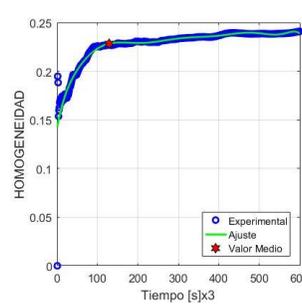
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 22. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

4.4.4. Muestra 3

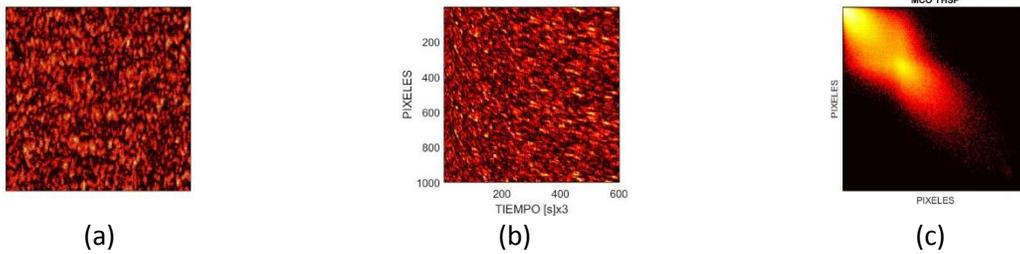


Fig. 23. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP

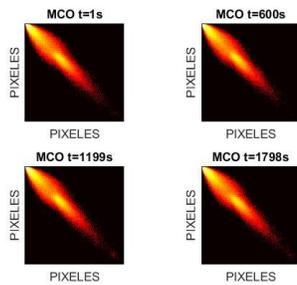


Fig. 24. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos

Tabla 4. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.

	Valor_Medio	Tiempo_medio_sx3
MI	620.12	172.13
Correlación	0.73835	157.91
SMA	0.00020169	496.82
Homogeneidad	0.13289	193.09

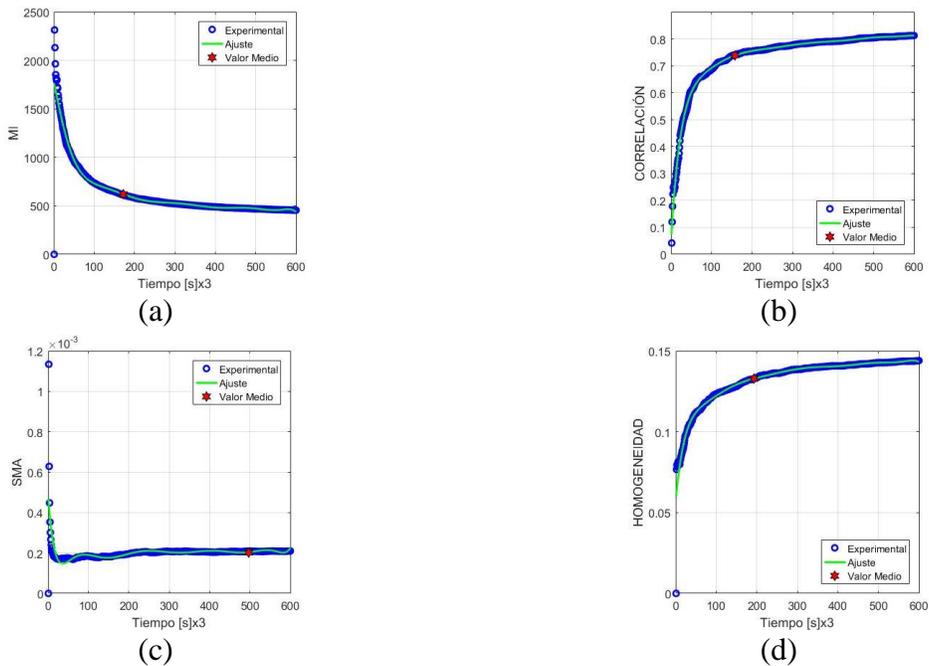


Fig. 25. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

4.4.5. Muestra 4

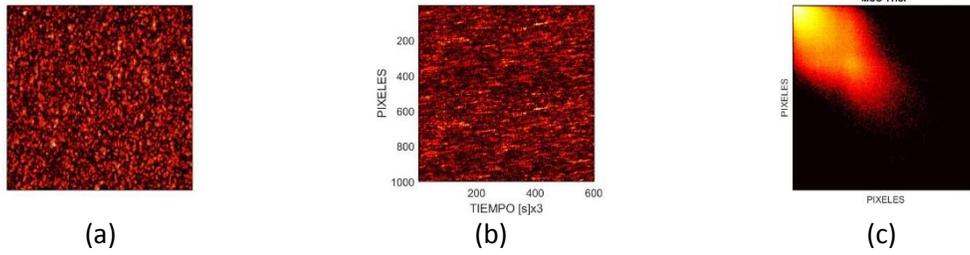


Fig. 26. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP

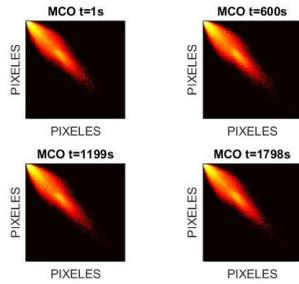
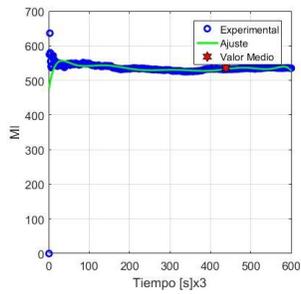


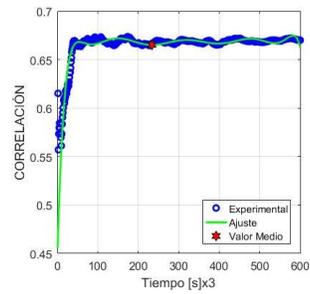
Fig. 27. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos

Tabla 5. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.

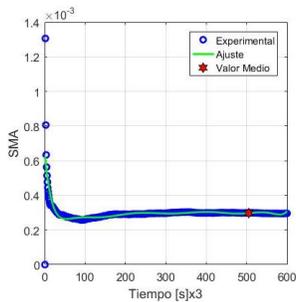
	Valor_Medio	Tiempo_medio_sx3
MI	535.97	438.46
Correlación	0.66514	233.81
SMA	0.00029766	505.27
Homogeneidad	0.13802	507.77



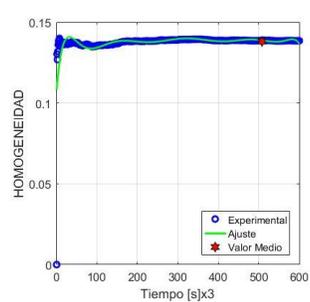
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 28. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

4.4.6. Muestra 5

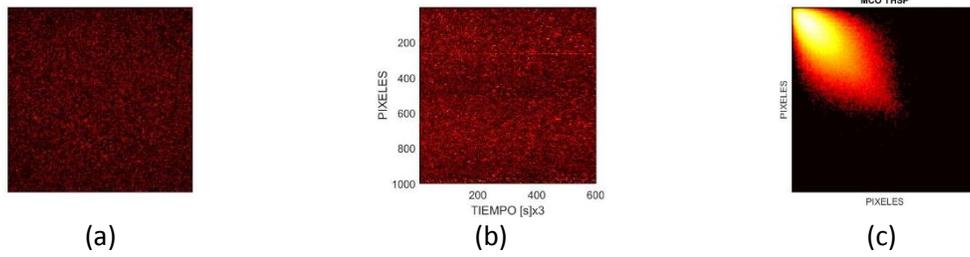


Fig. 29. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP

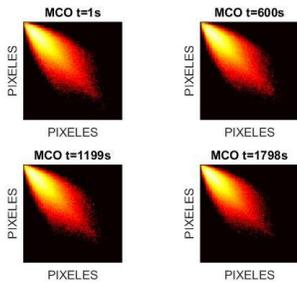
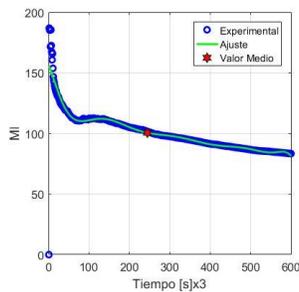


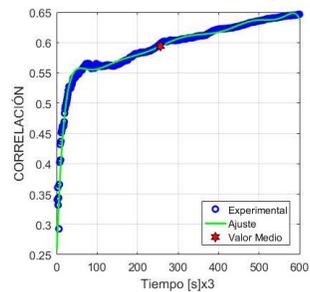
Fig. 30. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos

Tabla 6. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.

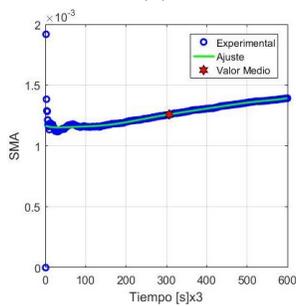
	Valor_Medio	Tiempo_medio_sx3
MI	100.52	244.8
Correlación	0.59402	256.79
SMA	0.0012596	307.04
Homogeneidad	0.22842	282.01



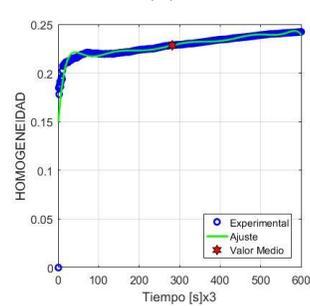
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 31. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

4.4.7. Muestra 6

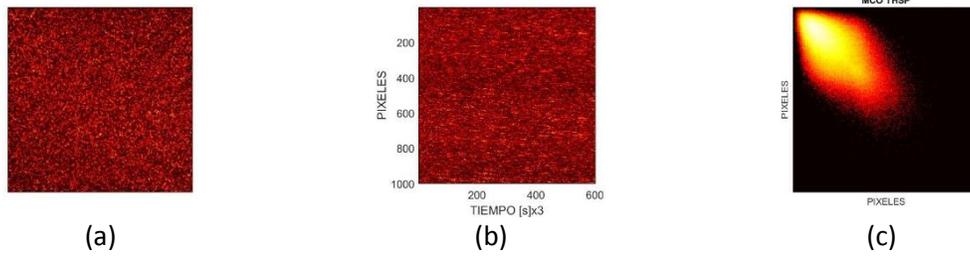


Fig. 32. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP

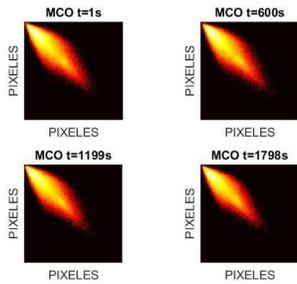
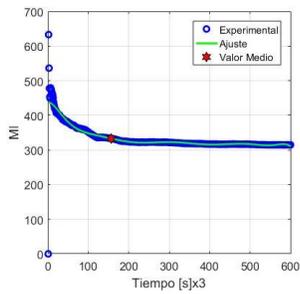


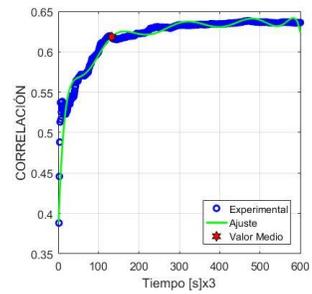
Fig. 33. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos

Tabla 7. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 30 minutos.

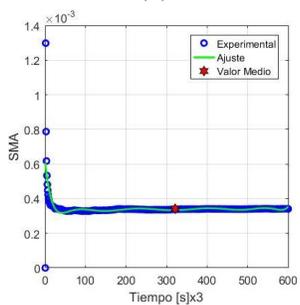
	Valor_Medio	Tiempo_medio_sx3
MI	332.94	156.62
Correlación	0.61843	132.72
SMA	0.00034207	321.2
Homogeneidad	0.15188	136.6



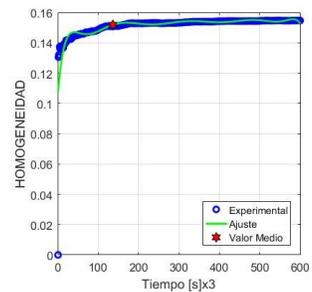
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 34. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

Muestra 1: a partir de las curvas de la figura 19, que corresponden a los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad, se estiman el tiempo medio de actividad de la muestra. En la Tabla 2 se incluyen los tiempos medios estimados para un tiempo de actividad total de 30 min; en este caso, los tiempos medios de actividad estimados a partir de los descriptores MI, Homogeneidad y SMA son similares, por lo tanto, el promedio es 10.67 min. El tiempo medio de actividad a partir de la correlación es cerca del doble (19.4 min) con respecto al estimado a partir de los otros tres descriptores.

Muestra 2: la figura 22 corresponden a los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad. En la Tabla 3 se incluyen los tiempos medios estimados para un tiempo de actividad total de 30 min; en este caso, los tiempos medios de actividad estimados a partir de los descriptores MI, Correlación y Homogeneidad son similares, por lo tanto, el promedio es 7.38 min. El tiempo medio de actividad a partir de la SMA es mayor que el doble (16.57 min) al valor estimado a partir de los otros tres descriptores.

Muestra 3: la figura 25 corresponden a los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad. En la Tabla 4 se incluyen los tiempos medios estimados para un tiempo de actividad total de 30 min; en este caso, los tiempos medios de actividad estimados a partir de los descriptores MI, Correlación y Homogeneidad son similares, por lo tanto, el promedio es 8.71 min. El tiempo medio de actividad a partir de la SMA es de 24.84 min.

Muestra 4: la figura 28 corresponden a los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad. En la Tabla 5 se incluyen los tiempos medios estimados para un tiempo de actividad total de 30 min; en este caso, los tiempos medios de actividad estimados a partir de los descriptores MI, SMA

y Homogeneidad son similares, por lo tanto, el promedio es 24 min. El tiempo medio de actividad a partir de la Correlación es de 11.69 min.

Muestra 5: la figura 31 corresponden a los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad. En la Tabla 6 se incluyen los tiempos medios estimados para un tiempo de actividad total de 30 min; en este caso, los tiempos medios de actividad estimados a partir de los cuatro descriptores son similares, el promedio es 13.5 min.

Muestra 6: la figura 34 corresponden a los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad. En la Tabla 7 se incluyen los tiempos medios estimados para un tiempo de actividad total de 30 min; en este caso, los tiempos medios de actividad estimados a partir MI, Correlación y Homogeneidad son similares, el promedio es 7 min. El tiempo medio de actividad a partir de la SMA es 15.6 min.

Para el tiempo de 30 minutos de actividad de las muestras, solo en el caso de la muestra “aloe vera”, se obtuvo mediante los cuatro descriptores un tiempo medio de movilidad de dispersores similar, lo que no ocurrió para las otras 5 muestras; se propone la hipótesis de que cada tipo de muestra requiere un tiempo de muestro particular, si la idea es aplicarlo, por ejemplo, en la estimación del tiempo de vida media de una muestra biológica. De otra parte, otro criterio y tal vez el de más acertado es hasta cuento los cuatro criterios den la misma respuesta de tiempo medio; como se pudo demostrar acelerando el proceso de deshidratación de dos de las muestras, mediante un horno óptica construido artesanalmente; los resultados se muestran en el apartado 4.5.

Análisis de la MCO

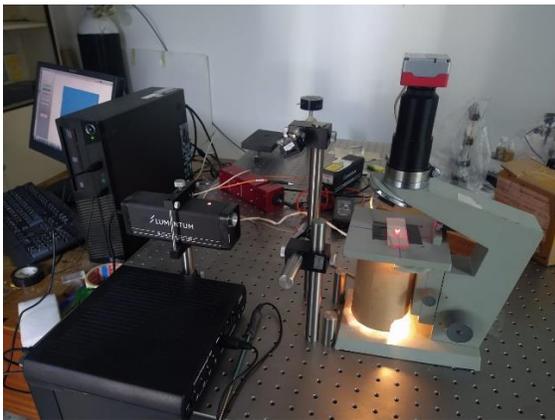
Con respecto al descriptor comatriz, en todos los mapas (figuras 17c, 20c, 23c, 26c, 29c, 32c) de las comatrices de las THSP se evidencia la distribución característica debida a cuando los puntos dispersores de la muestra presentan una alta movilidad. La dispersión de puntos con respecto a la diagonal en la figura 17.c. y la figura 20.c., correspondientes a las muestras 1 y 2, tienen un comportamiento similar en el tiempo; la actividad de la muestra no es muy alta y su disminución es de una manera muy lenta, aunque se observa una leve tendencia hacia la diagonal y una disminución en el contraste, no son diferencias marcadas en este descriptor; hecho que se puede verificar en las figuras 18 y 21 que muestran también la MCO, pero en cuatro instantes de tiempo diferentes.

Las figuras 23.c. y 26.c. corresponden a las muestras 3 y 4, y son hojas de la misma especie, pero en tiempos diferentes de maduración. La muestra 3 es de una hoja verde, mientras que la muestra 4 es de una hoja deshidrata por acción de las condiciones. La diferencia entre el comportamiento de estas matrices de coocurrencia está en la mayor dinámica que tiene la muestra 3 por lo que los cambios en sus puntos de intensidad con respecto a la diagonal van a ser más notorios que en la muestra 4 debido a que esta última ya se encuentra en un punto de actividad menor. Observando el cambio de la MCO en diferentes instantes de tiempo, (figuras 24 y 27), se corrobora lo descrito por la MCO de las respectivas THSP para cada muestra.

Estos mismos análisis se aplican para las comatrices de las muestras 5 y 6; definitivamente el potencial de la estadística que contiene la comatriz es que a partir de ella se puede calcular los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad.

4.5. Medida del tiempo medio de deshidratación artificial

Se construyó un horno óptico de gradiente vertical y de núcleo cilíndrico (ver figura 35), el cual se adaptó al arreglo de la figura 11 con el propósito de hacer un estudio de factibilidad, de aplicación de la técnica de biospeckle en la medición del tiempo medio de deshidratación de material vegetal. El horno permite deshidratar la muestra a temperatura constante. La fuente de calor es una lámpara de 45 watts /110 V; la figura 35 es la curva de temperatura del horno en función del tiempo, medida a 2 cm entre el filamento de la lámpara y el portamuestras; esta curva se levantó usando una termocupla; la temperatura sobre la muestra se controla por movimiento vertical del portamuestras. Para la posición de 2 cm la temperatura máxima fue de aproximadamente de 40 °C.



(a).



(b).

Fig. 35. (a). Montaje experimental con la fuente de calor, (b). Fuente de calor.

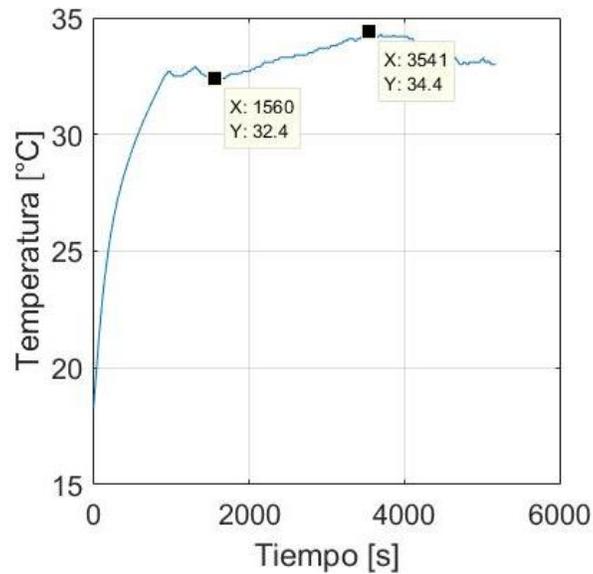


Fig. 36. Temperatura del sistema desde que se enciende la fuente de calor, hasta que alcanza una temperatura estable.

4.5.1. Preparación de las muestras

Las pruebas se realizaron con muestras del tipo 1 y 2. Se prepararon siguiendo el mismo procedimiento del apartado 4.2. Las muestras se insertaron al portamuestras a temperatura constante de 40 °C; desde ese mismo instante se inició la toma de las imágenes de biospeckle, durante 90 min.

Los resultados se muestran en los siguientes apartados 4.5.2 y 4.5.3.

4.5.2. Muestra 1

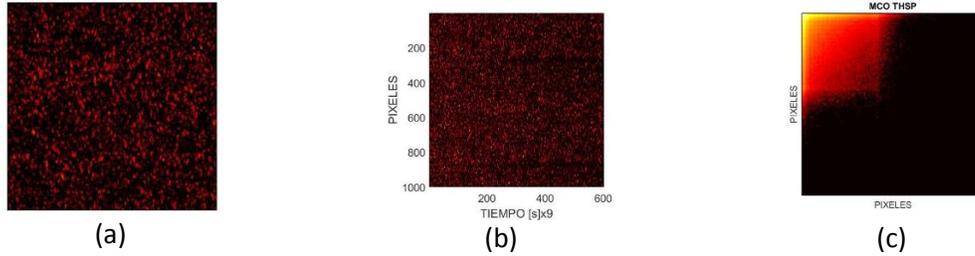


Fig. 37. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP

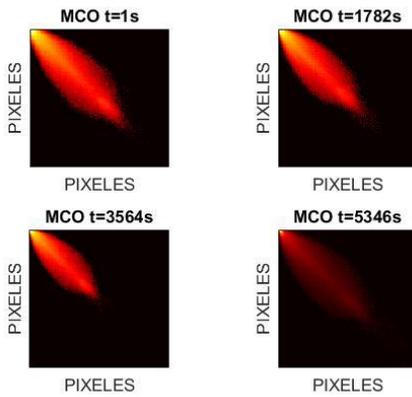


Tabla 8. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 1 h y 30 minutos.

	Valor_Medio	Tiempo_medio_sx9
MI	357.08	333.1
Correlación	0.019689	352.7
SMA	0.005275	345.1
Homogeneidad	0.22703	326.62

Fig. 38. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos

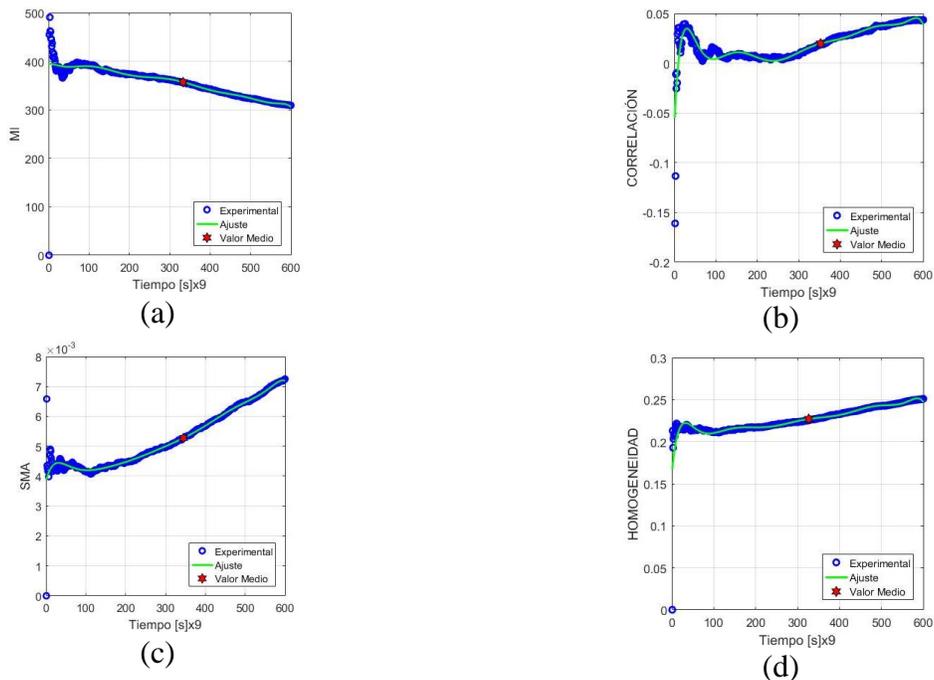


Fig. 39. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

4.5.3. Muestra 2

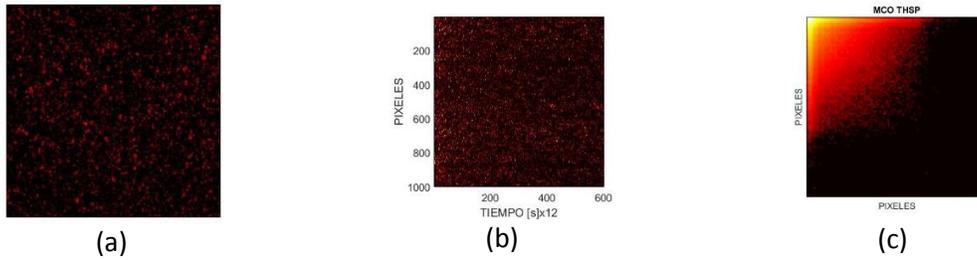


Fig. 40. (a). Imagen del Patrón de speckle en $t=100s$, (b). Matriz THSP, (c). Comatriz de la THSP

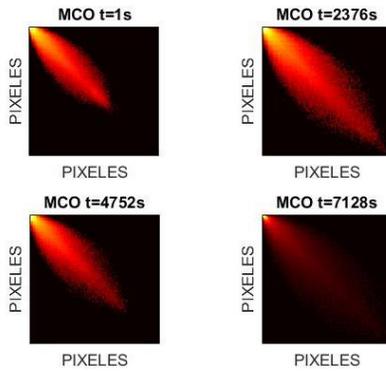


Tabla 9. Tiempo de actividad media de la muestra para cada descriptor durante 2 horas.

	Valor_Medio	Tiempo_medio_sx12
MI	143.18	233.19
Correlación	0.087081	320.64
SMA	0.016091	288.74
Homogeneidad	0.33128	275.37

Fig. 41. Comatriz de cada patrón speckle en $t=1, 600, 1199, 1798$ segundos

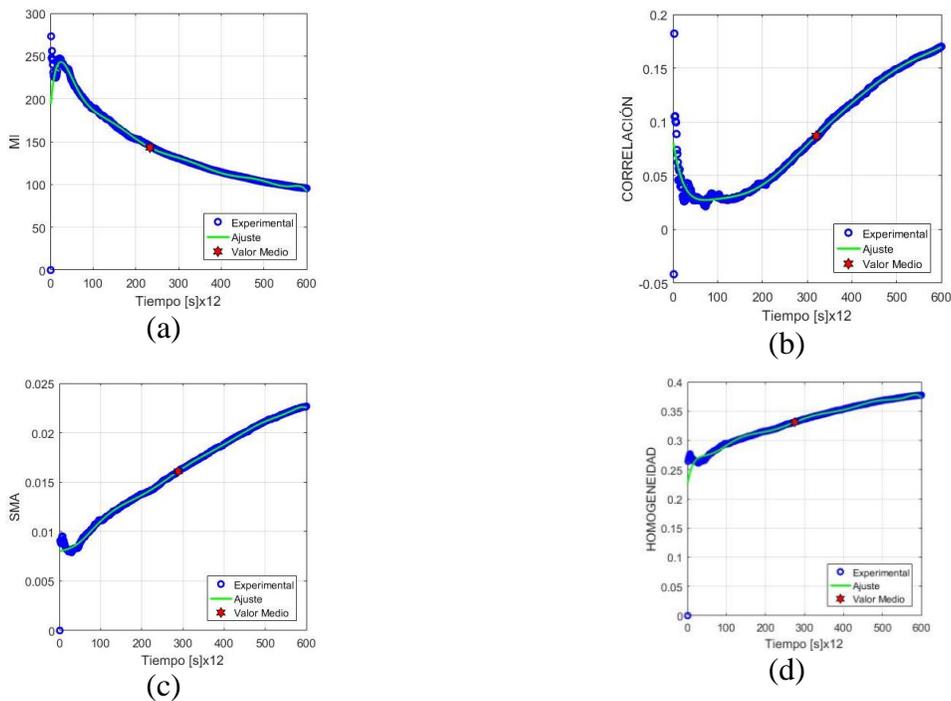


Fig. 42. (a). Momento de Inercia (MI), (b). Correlación, (c). Segundo Momento Angular (SMA), (d). Homogeneidad

Muestra 1: la figura 39 corresponden a los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad. En la Tabla 8 se incluyen los tiempos medios estimados para un tiempo de deshidratación total de 90 min; los tiempos medios de actividad para los cuatro descriptores son similares, el promedio es 50.9 min.

Muestra 2: la figura 42 corresponden a los descriptores MI, Correlación, SMA y Homogeneidad. En la Tabla 9 se incluyen los tiempos medios estimados para un tiempo de deshidratación total de 120 min; los tiempos medios de actividad para los cuatro descriptores son similares, el promedio es 42 min.

En las dos muestras se observan comportamientos similares en los descriptores. El comportamiento del MI (figura 39.a) decrece siendo un comportamiento característico de una muestra cuya actividad biológica está disminuyendo en el tiempo, debido a que este descriptor mide la diferencia del contraste entre pixeles vecinos, diferencia que va ir disminuyendo a medida que disminuya la actividad. En la correlación (figura 39.b.) se observa un crecimiento en el comportamiento de este descriptor debido a la disminución de la actividad biológica. El SMA (figura 39.c.) describe un comportamiento creciente ya que, al estar relacionado con la entrada de energía en el sistema, va a aumentar su valor a medida que la cantidad de energía disminuya en el proceso. En la figura 39.d. se tiene la homogeneidad que mide la cercanía de la matriz de coocurrencia con la diagonal, que va a ser mayor a medida que la muestra reduzca su actividad biológica ya que en la matriz de coocurrencias se observa una tendencia hacia la diagonal.

Análisis de la MCO

Las figuras 37.c. y 40.c. correspondientes a la matriz de coocurrencias de las muestras 1 y 2 respectivamente, muestran un comportamiento similar. Al comienzo de la exposición, estas notan una alta dispersión e intensidad de los puntos de intensidad con respecto a la diagonal, debido a la alta actividad biológica presentada en ese tiempo. A medida que el tiempo transcurre, se nota como el contraste de intensidades va disminuyendo y los valores se van acercando a la diagonal. Cabe resaltar que no se observa un comportamiento totalmente diagonal, debido a que el proceso de deshidratación fue acelerado debido al calentamiento mediante el horno, hasta llegar a la deshidratación total de la muestra. En las figuras 38 y 41 se tiene la MCO en cuatro instantes de tiempo diferente en los que se advierten estos cambios en el contraste y forma de la dispersión de los puntos de intensidad a medida que el tiempo de exposición aumenta.

Conclusiones y perspectivas

Esta primera parte de la investigación de imágenes speckle, se concluye con el estudio de los fundamentos del fenómeno speckle dinámico, desarrollo de algoritmos computacionales de procesamiento de imágenes speckle, el diseño e instalación de un arreglo óptico e interfaz de control para la adquisición de las imágenes speckle, siendo esta la base para desarrollar en una segunda etapa un prototipo para estudio de actividad farmacológica en especímenes de escala bacteriana.

Se desarrollaron algoritmos para estimar el tiempo medio de actividad biológica de una muestra; a partir de la construcción de la matriz THSP se calcularon los descriptores estadísticos de las imágenes de speckle dinámico generadas por las muestras: el histograma, la comatriz, el momento de inercia, el coeficiente de correlación, el segundo momento angular y la homogeneidad.

Se desarrolló un algoritmo que permite el procesamiento de las imágenes obtenidas del arreglo experimental. Éste captura los patrones de speckle y calcula los descriptores y de manera automática entrega las curvas del comportamiento de la actividad biológica en las muestras, para cada descriptor utilizado y calcula el tiempo de vida medio de actividad de la muestra.

El arreglo de biospeckle de la fig.11 se adaptó con un horno óptico el cual se utilizó para medir el tiempo medio de deshidratación de material vegetal; así se demostró que la técnica de biospeckle en estas condiciones se puede aplicar en la deshidratación de material vegetal u otro tipo de tejido.

Del comportamiento de los descriptores implementados se concluye que el momento de inercia (MI) y la homogeneidad, son tal vez los más adecuados para el análisis del comportamiento de la actividad biológica de todas las muestras, esto, se basa en la descripción de los datos obtenidos en las tablas, estos descriptores se sugieren para todas las muestras. Sin embargo, el criterio adecuado para mayor precisión en la estimación del tiempo de medio de actividad biológica es hacer un muestreo suficiente tal que se alcance la similitud en los valores de tiempo medios estimados con los cuatro descriptores.

Perspectivas de trabajo

Queda como perspectiva de trabajo, desarrollar una interfaz gráfica amigable con el usuario, para el manejo de los algoritmos obtenidos en este trabajo; implementada en un todo en un único leguaje programación, adquisición y procedimiento. Así mismo, proponemos como perspectiva de trabajo implementar los descriptores Fujii, LASCA y LASTCA, entre otras, y validar el arreglo implementado en modo de operación de speckle subjetivo, implementar otras aplicaciones, por ejemplo, estudio de actividad farmacológica sobre especímenes de escala bacteriana.

Bibliografía

- [1] A. Yoshihisa y A. Toshimitsu, «BIOSPECKLE PHENOMENA AND THEIR APPLICATIONS TO BLOOD-FLOW MEASUREMENTS,» de *Optics, Electro-Optics, and Laser Applications in Science and Engineering*, Los Angeles, CA, United States, 1991.
- [2] M. E. E. Ramirez, L. L. Martí y A. O. R. Contreras, «Dos configuraciones diferentes para la descripción temporal de actividad de *Escherichia coli* mediante speckle dinámico,» *Revista Mexicana de Física*, vol. 57, nº 5, pp. 446-451, 2011.
- [3] R. Nassif, C. Abou Nader, F. Pellen, G. Le Brun, M. Abboud y B. Le Jeune, «Retrieving controlled motion parameters using two speckle pattern analysis techniques: spatiotemporal correlation and the temporal history speckle pattern,» *APPLIED OPTICS*, vol. 52, nº 31, pp. 7564-7569, 2013.
- [4] Y. Naomichi, S. Yuichi, K. Masaki, F. Hideki y A. Yoshihisa, «Imaging of blood flow and blood concentration change in a frame rate using laser speckle: Methods for image analysis,» *Optics & Laser Technology*, vol. 64, pp. 352-362, 2014.
- [5] Y. Naomichi y A. Yoshihisa, «Probing depth and dynamic response of speckles in near infrared region for spectroscopic blood flow imaging,» *Optics & Laser Technology*, vol. 78, pp. 106-112, 2015.
- [6] M. Z. Ansari, H. C. Grassi, H. Cabrera y E. D. J. Andrades, «Real time monitoring of drug action on *T.cruzi* parasites using a biospeckle laser method,» *Laser Physics*, vol. 26, 2016.

- [7] M. Z. Ansari, H. C. Grassi, H. Cabrera, A. Velásquez y E. D. J. Andrades, «Online fast Biospeckle monitoring of drug action in Trypanosoma cruzi parasites by motion history image,» *Lasers Med Sci*, 2016.
- [8] R. A. Montalvo, M. Asmad, I. Choque y G. Baldwin, «Interferometría speckle para evaluar la flexion de una barra de aluminio,» *Revista Mexicana de Física*, vol. 62, pp. 125-134, 2016.
- [9] M. A. Toderi, B. D. Riquelme y G. E. Galizzi, «An experimental approach to study the red blood cell dynamics in a capillary tube by biospeckle laser,» *Optics and Lasers in Engineering*, vol. 127, 2020.
- [10] M. D. Catalano, F. Pujaico Rivera y R. A. Braga, «Viability of biospeckle laser in mobile devices,» *Optik- International Journal for Light and Electron Optics*, vol. 13, pp. 897-905, 2019.
- [11] S. Kumari y A. K. Nirala, «Monitoring of functional blood flow on human hand due to effect of different treatments by laser biospeckle,» *Lasers in Medical Science*, 2019.
- [12] M. Hirai, D. Endo, H. Gonome, T. Kono, J. Yamada y U. M. Rajagopalan, «Laser biospeckle metrology in investigating plant-sound interactions,» de *SPIE BiOS*, San Francisco, California, United States, 2020.
- [13] F. A. Marengo Rodriguez, *Medición de la distribución de fase en interferometría de speckle temporal usando descomposición empírica de modos y transformada de Hilbert, Tesis doctoral*, Rosario, Argentina, 2008.
- [14] H. R. d. J. Henao, *Estudio de Tecnicas Speckle Opto-Digitales, Tesis doctoral*, La Plata, Argentina, 1997.

- [15] E. R. da Silva, *Estudo das Propriedades do Biospeckle e suas Aplicações, Tesis de Maestría*, Sao Paulo, 2007.
- [16] A. Bergkvist, *Biospeckle-based Study of the Line Profile of Light Scattered in Strawberries, Tesis de maestría*, La Plata, Argentina, 1997.
- [17] Naturaleza Tropical, «<https://naturalezatropical.com/>,» [En línea]. Available: <https://naturalezatropical.com/dimorphotheca-ecklonis/>. [Último acceso: 23 05 2022].
- [18] 2009 plantasornamentales, «<http://plantasornamentales.tamesis.blogspot.com/>,» 11 2009. [En línea]. Available: <http://plantasornamentales.tamesis.blogspot.com/2009/11/geranio-y-novio.html>. [Último acceso: 23 05 2022].
- [19] Wikipedia, «<https://es.wikipedia.org/>,» 22 04 2021. [En línea]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Zantedeschia_aethiopica. [Último acceso: 23 05 2022].
- [20] Wikipedia, «<https://es.wikipedia.org/>,» 20 05 2022. [En línea]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Aloe_vera. [Último acceso: 23 05 2022].
- [21] Arboles Frutales, «<https://arbolesfrutales.org/>,» [En línea]. Available: <https://arbolesfrutales.org/la-mora-silvestre-caracteristicas-y-cultivo/>. [Último acceso: 23 05 2022].
- [22] R. A. B. J. Hector J. Rabal, *Dynamic Laser Speckle and Applications*, CRC press, 2009.
- [23] R. A. Braga, «Challenges to Apply the Biospeckle Laser Technique in the Field,» *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, vol. 58, 2017.
- [24] A. Chatterjee, P. Singh, V. Bhatia y S. Prakash, «An efficient automated biospeckle indexing strategy using morphological and geo-statistical descriptors,» *ELSEVIER*, vol. 134, 2020.

- [25] B. Mandracchia, J. Palpacuer, F. Nazzaro, V. Bianco, R. Rega, P. Ferraro y S. Grilli, «Biospeckle Decorrelation Quantifies the Performance of Alginate-Encapsulated Probiotic Bacteria,» *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 25, 2019.
- [26] C. Schott, J. Steingroewer, T. Bley, U. Cikalova y B. Bendjus, «Biospeckle-characterization of hairy root cultures using laser speckle photometry,» *Engineering in Life Sciences*, vol. 20, n° 7, pp. 287-295, 2020.
- [27] C. A. Nader, J. M. Tualle, E. Tinet y D. Etti, «A New Insight into Biospeckle Activity in Apple Tissues,» *Sensors*, vol. 19, n° 3, p. 497, 2019.
- [28] R. F. Pujaico y B. R. Alves, «Selection of statistical indices in the biospeckle laser analysis regarding filtering actions,» *ELSEVIER*, vol. 394, pp. 144-151, 2017.
- [29] G. A. Meza, N. Bolognini, M. Tebaldi y J. E. Rueda, «Análisis de Registros de Patrones de Speckle Modulado de Baja Frecuencia en un Cristal BSO,» *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 8, n° 1, pp. 1-8, 2010.
- [30] G. H. Sendra, H. J. Rabal y D. R. Ávalos, *Análisis de actividad en patrones de speckle dinámico*, La Plata, Argentina, 2009.
- [31] J. E. Rueda, A. R. Salazar y J. Meneses, «Construcción de un scanner óptico para registrar imágenes 3-d utilizando la técnica de triangulación láser,» *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 2, n° 002, pp. 65-72, 2004.
- [32] J. E. Rueda y M. C. Lasprilla, «INTERFEROMETRÍA POR CORRIMIENTO DE FASE PARA CARACTERIZAR MATERIALES ELECTRO-ÓPTICOS,» *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 4, n° 1, 2006.

- [33] M. Molina, M. d. C. Lasprilla, M. Tebaldi y N. Bolognini, «Optimización del Esquema Experimental para Registro de Speckles Generados a Partir de Superficies Reflectantes,» *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 7, nº 2, pp. 1-6, 2009.
- [34] M. Molina, M. Tebaldi y N. Bolognini, «EFICIENCIA DE DIFRACCIÓN DEL REGISTRO DE SPECKLE MODULADOS GENERADOS A PARTIR DE SUPERFICIES REFLECTO-DIFUSORAS,» *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 10, nº 2, 2012.
- [35] M. D. Catalano, R. F. Pujaco y R. A. Braga, «Viability of biospeckle laser in mobile devices,» *ELSEVIER*, vol. 183, pp. 897-905, 2019.
- [36] M. Z. Ansari, A. Mujeeb y A. K. Nirala, «Assessment of biological leaf tissue using biospeckle laser imaging technique,» *Laser Physics*, vol. 28, nº 6, 2018.
- [37] P. M. Pieczywek, M. Nowacka, M. Dadan, A. Wiktor, K. Rybak, R. D. Witrowa y A. Zdunek, «Postharvest Monitoring of Tomato Ripening Using the Dynamic Laser Speckle,» *Sensors*, vol. 18, nº 4, 2018.
- [38] P. Singh, A. Chatterjee, V. Bhatia y S. Prakash, «Application of laser biospeckle analysis for assessment of seed priming treatments,» *Elsevier*, vol. 169, 2020.
- [39] T. P. Singh, A. Chatterjee, R. L. Singh, S. Rana, V. Bhatia y S. Prakash, «Laser biospeckle technique for characterizing the impact of temperature and initial moisture content on seed germination,» *ELSEVIER*, vol. 153, 2022.
- [40] M. E. Ramírez, H. Cabrera, H. Grassi y et-al, «Digital imaging information technology for biospeckle activity assessment relative to bacteria and parasites.,» *Lasers Med Sci*, vol. 32, p. 1375–1386, 2017.

- [41] B. J. R. Alves, «When noise became information: State-of-the-art in biospeckle laser,» *SciELO - Scientific Electronic Library Online*, vol. 41, n° 4, 2017.
- [42] R. Pandiselvam, M. V. A. Kothakota, S. Ramesh, R. Thirumdas y P. Juvvi, «Biospeckle laser technique – A novel non-destructive approach for food quality and safety detection,» *Elsevier*, vol. 97, pp. 1-13, 2020.
- [43] R. Salambue, A. Adnan y M. Shiddiq, «Investigation of the ripeness of oil palm fresh fruit bunches using bio-speckle imaging,» *IOP Science, Journal of Physics: Conference Series*, vol. 978, pp. 28-30, 2017.
- [44] X. Tang, P. Zhong, Y. Gao y H. Hu, «Numerical model for evaluating the speckle activity and characteristics of bone tissue under the biospeckle laser system,» *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, vol. 6, n° 06, 2021.
- [45] Y. S. K. De Silva, R. U. Maheswari, H. Kadono y D. Li, «Positive and negative phenotyping of increasing Zn concentrations by Biospeckle Optical Coherence Tomography in speedy monitoring on lentil (*Lens culinaris*) seed germination and seedling growth,» *ELSEVIER*, vol. 2, 2021.
- [46] Z. Xu, C. Joenathan y B. M. Khorana, «Temporal and spatial properties of the time varying,» *Optical Engineering*, vol. 34, n° 5, pp. 1487-1502, 1995.