



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

ANÁLISIS DE SPECKLE DINÁMICO MEDIANTE FILTRADO POR
SEGMENTACIÓN.
www.bdigital.ula.ve

Autor: Maryalbis Patiño
Tutor: MSc. Carlos Leal
Co-Tutor: Dr. Alberto Patiño

Mérida - Venezuela, junio 2021



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

ANÁLISIS DE SPECKLE DINÁMICO MEDIANTE FILTRADO POR
SEGMENTACIÓN.

Trabajo Especial de Grado para Optar al Título de Licenciado en Física.

Autor: Maryalbis Patiño
Tutor: MSc. Carlos Leal
CoTutor: Dr. Alberto Patiño

Mérida - Venezuela, junio 2021

Agradecimiento

A mi mamá, tus esfuerzos son impresionantes y tu amor es para mí invaluable.

A mis hermanas Maryannis y Maryangis, mi abuela Marina y mi tía Luzmila, por el cariño y el apoyo moral que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

A Angela por estar siempre allí y ser parte significativa en mi vida. ¡Gracias Tita!

A mis amigos Manuel y Miguel, por la amistad incondicional, la compañía en esas noches de traspasos y por todas las tazas de café. Gracias por acompañarme en este camino.

A mi tutor el profesor Carlos Leal por guiarme en este trabajo, por la paciencia, el apoyo y la confianza, las enseñanzas académicas y de vida.

A la Universidad de los Andes, por ser el Alma Mater y la casa de estudio de la cual estoy orgullosa de pertenecer.

Al Laboratorio de Óptica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por brindarme la oportunidad de desarrollar mi tesis de pregrado y colaborar en mi formación como profesional.

A todos los que de una u otra manera aportaron al desarrollo de este trabajo.
GRACIAS.

Dedicatoria

A mi madre.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Agradecimiento	iii
Dedicatoria	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
Resumen	xi
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO 1	15
El problema	15
1.1 Planteamiento del Problema.....	15
1.2 Objetivo General	16
1.2.1 Objetivos Específicos	16
1.3 Justificación	16
CAPÍTULO 2	17
Marco Teórico	17
2.1 Fenómeno de speckle.....	17
2.2 Propiedades estadísticas de los patrones de Speckle	19
2.2.1 Estadística de primer Orden	19
2.2.1.1 El speckle como fenómeno de camino aleatorio	19
2.2.1.2 Estadísticas de la amplitud compleja	21
2.2.1.3 Estadística de intensidad y fase	22
2.2.2 Estadísticas de primer orden de sumas de patrones de speckle	25
2.2.2.1 Suma de patrones de speckle según la amplitud	25
2.2.2.2 Suma de patrones de speckle según la intensidad	26
2.2.3 Estadísticas de segundo orden.....	29
2.2.3.1 Función de autocorrelación y densidad espectral de potencia	30
2.2.3.2 Tamaño del speckle en profundidad	36
2.2.4 Estadísticas del speckle integrado	41
2.2.4.1 Integración espacial	42
2.2.4.2 Integración temporal	44
2.3 Speckle Dinámico.....	45

2.4 Modelos y métodos de Procesamiento	45
2.4.1 Modelos Teóricos y Numéricos	46
2.4.2 Análisis estadísticos.....	46
2.4.2.1 Método estadístico de segundo orden: THSP.....	46
2.4.2.2 Función de autocorrelación	47
2.4.3 Análisis Frecuenciales	47
2.4.4 Descriptores de actividad.	47
2.4.4.1 Método de Fujii (Diferencias promediadas).....	48
2.4.4.2 Diferencias generalizadas.....	48
2.4.4.3 Método LASCA.....	49
2.4.4.4 Diferencias Temporales	50
2.5 Aplicaciones.....	52
2.5.1 Aplicaciones en muestras biológicas.....	52
2.5.1.1 Aplicaciones agrícolas	53
2.5.1.2 Monitoreo de Parásitos	56
2.5.1.3 Aplicaciones Médicas	56
2.5.2 Aplicaciones en muestras no biológicas.....	57
2.5.2.1 Secado de pintura.....	58
2.5.2.2 Corrosión.....	58
2.5.3 Otras aplicaciones.....	59
2.6 Antecedentes	59
CAPÍTULO 3	61
Metodología.....	61
3.1 Equipos	61
3.1.1 Elementos ópticos del arreglo experimental	61
3.1.2 Elementos electrónicos del arreglo experimental	62
3.2 Muestra	63
3.3 Software utilizado.....	64
3.3.1 Aplicación ThorCam	64
3.3.2 Matlab®.....	65
3.4 Montaje experimental	66
3.4.1 Caracterización de la Cámara CCD	67
3.5 Adquisición de los datos	71

3.6 Procesado digital de los datos	72
3.6.1 Segmentación.....	72
3.6.2 Creación de videos a partir de filtrado por segmentación.....	76
3.6.3 Análisis de las intensidades por diferencias temporales	79
3.6.4 Análisis granulométrico.....	81
CAPÍTULO 4	87
Resultados y discusiones.....	87
4.1 Selección de los parámetros de adquisición de datos.....	87
4.2 Análisis de intensidades.	88
4.3 Análisis Granulométrico.....	90
4.3.1 Selección del umbral para el análisis granulométrico	90
4.3.2 Calculo de parámetros granulométricos	93
CAPÍTULO 5	112
Conclusiones y recomendaciones	112
6.1 Conclusiones.....	112
6.2 Recomendaciones.....	113
REFERENCIAS	115
Anexos	124
Anexo 1.....	124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1 Concentraciones y tamaños medios de bacterias y levaduras en los granos de kéfir.	63
Tabla 2 Parámetros geométricos que se pueden determinar con el comando regionprops (110).....	82
Tabla 3 Codificación de las variables utilizadas.	86
Tabla 4 Parámetros para la adquisición de datos óptima.	87
Tabla 5 Muestras de concentraciones por volumen relativo.	88
Tabla 6 Variación de la concentración relativa V/V y la intensidad.	89
Tabla 7 Variación del diámetro equivalente en función del umbral.	90
Tabla 8 Comparación entre el umbral medio por cada fotograma y el calculado automáticamente.	91
Tabla 9 Comparación entre el valor del umbral calculado y el obtenido por el ajuste de la función bigaussiana.	92
Tabla 10 Resultado análisis granulométrico.	93

Tabla 11 Variación de la excentricidad en función del tipo de procesamiento.....	104
Tabla 12. Variación de la concentración vs el producto área número de motas.	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1 Patrón de Speckle.....	17
Figura 2 a) Speckle Objetivo y b) Speckle subjetivo (11).	18
Figura 3 Transmisión de luz coherente a través de un objeto translúcido (12).	18
Figura 4 Paseo aleatorio en el plano complejo (15).....	20
Figura 5 Función densidad de probabilidad de intensidad de un patrón de speckle (14).....	24
Figura 6 Funciones densidad de probabilidad para intensidad de la suma de dos patrones de speckle (14).....	28
Figura 7 Contraste para la suma de dos patrones de speckle.	29
Figura 8 Geometría de propagación libre para la formación de speckle (10).	30
Figura 9 Tamaño de motas promedio calculado por el método de autocorrelación (26).....	33
Figura 10 Geometría de formación de imagen para la formación de speckle (28). ...	35
Figura 11 Grafico de la intensidad normalizada para a) punto circular y b) punto cuadrado (15).....	38
Figura 12 Región de observación en el plano focal posterior de una lente positiva (15).....	38
Figura 13 Área de coherencia de onda normalizada vs la desviación estándar de la fase (14).....	40
Figura 14 Laser DPSS (98).	61
Figura 15 Microscopio Nikon SBR-kt (99).....	61
Figura 16 Cámara CCD ThorLabs (101)	62
Figura 17 Granos de Kéfir (103).	63
Figura 18 Muestra de 198 ml de kéfir y agua destilada.	64
Figura 19 Interfaz de ThorCam (105).....	65
Figura 20 Montaje experimental.....	66
Figura 21 Interfaz ThorCam, Camera Settings (105).	68
Figura 22 Respuesta cámara CCD en función del tiempo de exposición para cada uno de los láseres.....	69
Figura 23 Sensibilidad relativa (106).....	69
Figura 24 Ajuste de potencia de los láseres. A) Parámetros de adquisición de la cámara, B) Perfiles laser rojo, C) Perfiles láser azul, D) Perfiles laser verde.	70
Figura 25 Respuesta cámara obtenida, para el valor de la intensidad media por el método de las diferencias temporales, para la imagen en escala de gris.	70
Figura 26 Tamaño del archivo de salida en función de la calidad.	71
Figura 27 Procesamiento de análisis digital de las imágenes con el método de segmentación.	72

Figura 28 Proceso de segmentación a) Imagen a color RGB. b) Imagen en escala de grises. c) Imagen segmentada (binaria).....	73
Figura 29 Objetos identificados en un fotograma, mediante umbral por método de Otsu.....	74
Figura 30. Ajuste grueso del umbral.....	74
Figura 31 Ajusto fino del umbral.....	75
Figura 32 Objetos identificados en un fotograma mediante el cálculo propuesto.....	75
Figura 33 Superficie de un fragmento de un fotograma, donde se muestra la diferencia entre las imágenes de sin umbral y filtrada por el umbral.	75
Figura 34 Fotograma de un video. A) Fotograma original en RGB, B) Fotograma original en escala de grises, C) Fotograma filtrado por segmentación alta intensidad, D) Fotograma filtrado por segmentación baja intensidad.	77
Figura 35 Superficie de un fragmento de un fotograma, donde se muestra la diferencia entre las imágenes de alta y baja intensidad.	77
Figura 36. Flujograma la creación de los videos de alta y baja intensidad, mediante el filtrado por segmentación.....	78
Figura 37 Método de las diferencias temporales.	79
Figura 38 Flujograma para el procesamiento de los videos por el método de las diferencias temporales.....	80
Figura 39 Flujograma de cálculos granulométricos.....	85
Figura 40 Muestra utilizada y agua destilada, para realizar diluciones V/V.....	87
Figura 41 Variación de la concentración relativa V/V y la intensidad.	90
Figura 42 Ajuste función bigaussiana para variación del número de motas vs el umbral.	92
Figura 43 Relación parámetros geométricos granulometría con el umbral.	96
Figura 44 Variación del diámetro vs FWHMM.	97
Figura 45 Variación del diámetro vs HFWHM.	98
Figura 46 Variación del diámetro vs VFWHM.	98
Figura 47 Variación del diámetro vs semieje mayor.	99
Figura 48 Variación del diámetro vs semieje menor.	99
Figura 49 Variación del diámetro vs ángulo.	100
Figura 50 Variación de la concentración V/V vs umbral.....	100
Figura 51 Variación de la concentración V/V vs diámetro.....	101
Figura 52 Variación de la concentración V/V vs área.	102
Figura 53 Variación de la concentración V/V vs HFWHM.....	102
Figura 54 Variación de la concentración V/V vs VFWHM.....	103
Figura 55 Variación de la concentración V/V vs FWHMM.	103
Figura 56 Variación de la concentración V/V vs la excentricidad.	104
Figura 57 Variación de la concentración V/V vs Semieje mayor.	105
Figura 58 Variación de la concentración V/V vs Semieje menor.	105
Figura 59 Variación de la concentración V/V vs ángulo alfa.	106
Figura 60 Variación de la concentración V/V vs número de motas.	107
Figura 61 Superficie de una sección de un fotograma, donde se muestra cómo cambia la granulometría en función de la variación del umbral.....	107
Figura 62 Variación de la concentración vs área y numero de motas.	108

Figura 63 Variación de la concentración vs el producto área número de motas.	109
Figura 64 Variación de la concentración V/V vs intensidad media en la imagen.	109
Figura 65 Variación del umbral vs intensidad media en la mota.	110
Figura 66 Variación de la Intensidad por diferencias temporales vs diámetro.	111
Figura 67 Variación de la Intensidad por diferencias temporales vs intensidad media en la mota	111
Figura 68. Variación del umbral vs área.	124
Figura 69. Variación del umbral vs diámetro.	124
Figura 70. Variación del umbral vs número de motas.	125
Figura 71. Variación del umbral vs semieje mayor.	125
Figura 72. Variación del umbral vs semieje menor.	126
Figura 73. Variación del umbral vs excentricidad.	126

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

ANÁLISIS DE SPECKLE DINÁMICO MEDIANTE FILTRADO POR SEGMENTACIÓN.

Trabajo Especial de Grado para Optar al Título de Licenciado en Física.

Autor: Maryalbis Patiño

Tutor: MSc. Carlos Leal

Co-Tutor: Dr. Alberto Patiño

Mérida - Venezuela, junio del 2021

Resumen

En este trabajo se plantea un nuevo método de análisis de patrones de speckle dinámico basado en las técnicas de segmentación de imágenes digitales. El método permite diferenciar patrones de alta y baja intensidad, mediante el diseño de un filtro por segmentación, con la finalidad de realizar análisis de intensidad y granulometría por separado, para luego ser comparados. Este nuevo enfoque se aplicó a imágenes de patrones de speckle dinámicos, subjetivos por transmisión, con un láser de (532 ± 1) nm y una potencia sobre la muestra de $(20,72 \pm 0,55)$ μ W, producidos por granos de kéfir en agua destilada, variando la concentración (de 30 a 100% con pasos de 5%) en porcentaje relativo volumen-volumen, tomando 3 videos de 200 fotogramas, por cada variación de concentración. Desarrollando nuevos métodos de análisis, que permiten mejorar la señal estudiada, la medición directa en la imagen de parámetros granulométricos del patrón de speckle dinámico, obteniendo una excelente correlación entre el método desarrollado y la función de autocorrelación, con un R^2 de 0,996 y un valor de pendiente cercano a uno ($1,045 \pm 0,010$). Se obtuvieron un conjunto de parámetros que permiten caracterizar la geometría de las motas del patrón de speckle. Mediante el desarrollo de un eficaz método para la determinación del umbral de binarización, siendo este un parámetro sensible, que puede producir variaciones en el tamaño medio del grano, manteniéndose una dispersión de los parámetros de interés del orden del 2%, al garantizar el uso de un umbral óptimo, en el procesamiento digital de los videos obtenidos.

Palabras Clave: Interferencia, Speckle dinámico, Análisis de imágenes, Segmentación, Umbral, Matlab®.

INTRODUCCIÓN

Cuando se inventó el láser en la década de 1960, nadie pudo prever la cantidad de aplicaciones que este tendría, uno de los primeros fenómenos revelado, fue que objetos iluminados con luz láser (acrónimo en inglés de *light amplification by stimulated emission of radiation*; Luz amplificada por emisión de radiación estimulada) presentaban un patrón de interferencia de apariencia granular. Las superficies de la mayoría de los materiales son rugosas, si se comparan con la escala de una longitud λ de onda del rango visible. Si se ilumina una superficie rugosa con una fuente de luz altamente coherente (todos los fotones están en fase) como la de un láser, la luz reflejada desde dicha superficie (o transmitida por el material), presenta un patrón de interferencia en forma granular o moteada (1).

A este patrón de interferencia se le dio el nombre de Speckle. Unos de los primeros en interesarse por el estudio de este fenómeno fueron Rigden y Gordon (2) y Oliver (3), fotografiaron y discutieron de manera cualitativa, las causas de un fenómeno en el que el área iluminada por luz láser, parece poseer una remarcable naturaleza granular, no visible a la luz ordinaria y en ambos trabajos lo atribuyeron a que las irregularidades en la superficie reflectante, provocaban un efecto de difracción aleatoria en el haz. Sin embargo, fueron Allen y Jones (4) quienes discutieron las bases teóricas y matemáticas de este efecto, revisando las ecuaciones utilizadas en el estudio de las ondas de radio difractadas, las cuales ya tenían bases matemáticas dadas por Ratcliffe (5).

Aunque si bien la definición de Speckle era algo nuevo de los 60, el fenómeno se puede encontrar en muchos trabajos a través de la historia años atrás. La primera observación estudiada por Exner [6] hace más de 140 años, en relación con un estudio de los anillos de Fraunhofer, formados cuando un haz de luz coherente, es difractado por una serie de partículas del mismo tamaño, distribuido al azar, usando luz blanca se encontró que la aureola central, exhibía una estructura radial fibrosa, mientras que con un filtro rojo esto fue reemplazado por una estructura granular fina y estas características, fueron ampliamente discutida en la literatura temprana por autores como Von Laue (6) y Lord Rayleigh (7) entre otros.

Tras la invención del láser y el “redescubrimiento” del speckle, se llevaban a cabo diferentes estudios de éste, en distintas ramas de la óptica, unos cuantos fueron para lograr su supresión en las imágenes holográficas o del ruido que causaba en las técnicas de radar, pero paralelamente, surgían técnicas de fotografía y métodos de medición de alta sensibilidad, para aplicar a superficies dispersoras, dando así origen a lo que se conoce hoy como interferometría speckle, son técnicas basadas en la comparación de dos o más distribuciones de speckle.

En un principio el registro de las distribuciones de speckle se realizaban en películas fotográficas, para luego hacer el procesado, pero a pesar de que era un método con alta sensibilidad, buena resolución y permanencia a largo plazo, era esencialmente un procedimiento lento, ya que involucraba el procesado químico de la emulsión fotográfica. Por lo tanto, a principio de los 70 se consideró la posibilidad de emplear un tubo de captación de televisión, para detectar el patrón de manchas, junto con algún medio que registrara las señales eléctricas que genera, para sustituir el registro fotográfico, dando inicio así a la interferometría electrónica del speckle o ESPI (*Electronic Speckle Pattern Interferometry*) por sus siglas en inglés.

La información era procesada electrónicamente y podía ser compatible con computadoras, por lo que existe la posibilidad de obtener medidas de desplazamiento, deformación, entre otros, directamente. Posteriormente, el desarrollo de hardware y software hizo posible el uso de dispositivos de cargas acopladas o CCD (*Charge-Coupled Device*) conectadas a computadoras, que poseen placas de adquisición y algoritmos de procesamiento de señales, de 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 posteriormente a la Interferometría de Speckle Temporal o TSPI (en inglés, *Temporal Speckle Pattern Interferometry*).

Actualmente las áreas de estudios del fenómeno de speckle comprenden (8): sus propiedades estadísticas, reducción del mismo en sistemas ópticos y holográficos, medición de rugosidad superficial, codificación y encriptación. Entre sus aplicaciones tenemos: en procesamiento de imágenes, segmentación y análisis de objetos con "actividad" (tejidos biológicos, pinturas, espumas, corrosión etc.), metrología, astronomía, entre otros. Los métodos de análisis de patrones de speckle dinámicos abarcan enfoques temporales, frecuenciales, espaciales o una combinación de estos (9).

Debido a las múltiples aplicaciones es necesario ampliar los métodos de análisis. Las técnicas convencionales de procesado digital, presentan dificultad al momento de visualizar pequeñas variaciones, presentes en los cambios del patrón de speckle, entre las existentes, el procesado digital por segmentación permite un análisis más detallado en las regiones de interés, por lo que este trabajo está centrado en el estudio del fenómeno de speckle dinámico (variable en el tiempo), a través del procesamiento digital aplicando un filtrado por segmentación, a las imágenes obtenidas de los patrones speckle, con la finalidad de evaluar un posible aumento de la sensibilidad de detección del sistema.

A través del desarrollo de un nuevo método de procesamiento, desarrollado en el software Matlab®, aprovechando las bondades del mismo y la facilidad de realizar de manera automatizada análisis complejos de un gran conjunto de datos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 1

El problema

1.1 Planteamiento del Problema

La metrología óptica, es un área de la óptica aplicada, relacionada al monitoreo de parámetros físicos que utiliza sistemas y métodos de no contacto, por tanto, permite realizar pruebas no invasivas y no destructivas. Entre las técnicas de monitoreo de esta área, tenemos la interferometría speckle. La interferometría speckle es el análisis de patrones de intensidad, producidos por la interferencia mutua entre frentes de onda coherentes, por tanto, los patrones están sujetos a fluctuaciones de intensidad. Estos patrones poseen forma granular y consiste en puntos brillantes donde la interferencia ha sido muy constructiva, puntos oscuros donde la interferencia ha sido muy destructiva, con niveles de irradiancia entre estos extremos.

La interferometría speckle, tiene la particularidad de proporcionar mediciones en tiempo real y con una alta sensibilidad de las variaciones en la microestructura de la superficie de un objeto o muestra, a través de las variaciones en el patrón de speckle, obteniendo resultados en tiempos cortos comparado con las técnicas convencionales. Combinada con un registro directo en cámara de video y algoritmos de procesamiento digital, es una técnica manipulable y con una amplia gama de aplicaciones científicas e industriales.

Esta posee diversos métodos de procesamiento y análisis, mediante el cual pueden ser estudiados los patrones, pero hay escasos ensayos que estudie la morfología de los granos de speckle, presentes en el patrón de variación de la intensidad y mucho menos que la relacionen con alguna medida característica de la muestra u objeto que produce el patrón. Por tanto, es de importancia desarrollar nuevos métodos para evaluar los cambios en las diferentes propiedades del grano de speckle.

En el presente trabajo, se plantea un nuevo método de procesado, basado en una técnica de procesamiento de imágenes digitales, denominada segmentación. En la segmentación una imagen en escalas de grises, se transforma en una, con solo dos posibles niveles de color (negro o blanco), es decir se binariza. El fundamento de la segmentación, también denominado umbralización, consiste en definir un valor de referencia, en el rango dinámico de la imagen, denominado umbral, evaluando pixel a pixel la imagen, para definir cualquier valor inferior como fondo y si está por encima forma parte de la imagen útil, para la identificación de los diferentes objetos presentes. Los métodos de segmentación convencionales (método de Otsu), no se ajustan estadísticamente al estudio de los patrones de speckle, debido a que no

segmenta de manera eficiente aquellas partes donde la intensidad es muy baja, por lo que se plantea una alternativa para definir el umbral para la binarización.

Adicional a esto, se someten los resultados de la segmentación a un análisis granulométrico, con la finalidad de definir nuevos parámetros que se espera permitan en próximos trabajos el hallazgo de nuevas relaciones entre las propiedades físicas de los granos de speckle y las variaciones de la intensidad, así como también establecer, relaciones más directas de las propiedades morfológicas de los granos con la muestra que produce el patrón de speckle.

1.2 Objetivo General

Diseñar un método de procesamiento de imágenes de speckle dinámico mediante filtrado por segmentación.

1.2.1 Objetivos Específicos

1. Diseñar un programa en Matlab® para la segmentación de imágenes de speckle dinámico.
2. Diferenciar entre los patrones de interferencia de alta y baja intensidad, para ser procesados de manera independiente.
3. Realizar cálculo de parámetros granulométricos de las imágenes de speckle dinámico.
4. Comparar los resultados obtenidos entre el procesamiento de las imágenes originales con los patrones de interferencia de alta y baja intensidad.

1.3 Justificación

La interferometría speckle es una técnica no invasiva, no destructiva que permite hacer mediciones en tiempo real, de las variaciones en la microestructura de la superficie de un objeto biológico o no, por lo que tiene una amplia cantidad de aplicaciones. Debido a las múltiples aplicaciones es necesario ampliar los métodos de análisis. Las técnicas convencionales de procesamiento digital, presentan dificultad al momento de visualizar las pequeñas variaciones presentes en los cambios del patrón de speckle y al momento de estimar el tamaño individual de una mota del patrón de interferencia. El tamaño medio de este grano se estima a través de la función de autocorrelación de la intensidad de speckle, pero esta estimación es fundamentalmente bidimensional, no hay una forma única de definir la anchura unidimensional de un solo grano, lo que motiva un gran interés en el desarrollo de métodos alternativos para la estimación del mismo. El procesamiento digital por segmentación permite un análisis más detallado en las regiones de interés, por lo tanto, el enfoque de esta investigación, es plantear un método de segmentación para el análisis de los patrones de speckle dinámico y un posterior análisis granulométrico para obtener como resultado una variedad de parámetros que se espera permita encontrar nuevas relaciones y abran el campo de estudio en futuros trabajos. Con la finalidad de aumentar la sensibilidad de estos métodos de análisis.

CAPÍTULO 2

Marco Teórico

2.1 Fenómeno de speckle

La gran mayoría de superficies, sintéticas o naturales, son extremadamente rugosas, si se compara con la escala de una longitud de onda óptica. Bajo iluminación por luz coherente, como la luz proveniente de un láser, las ondas reflejadas desde tal superficie, consiste en contribuciones de muchas áreas de dispersión independientes. La propagación de esta luz reflejada a un punto de observación distante da como resultado la adición de estos diversos componentes dispersos con retrasos relativos, que pueden variar de pocas a muchas longitudes de onda, dependiendo de la superficie microscópica y la geometría, la interferencia de estas ondas desfasadas, pero coherentes, da como resultado el patrón granular que conocemos como Speckle (ver Figura 1).



Figura 1 Patrón de Speckle.

Si el punto de observación se mueve, las longitudes de la trayectoria recorrida por los componentes dispersos cambian, y un valor nuevo e independiente de intensidad puede resultar del proceso de interferencia. Por tanto, el patrón de speckle consiste en puntos brillantes, donde la interferencia ha sido muy constructiva, puntos oscuros donde la interferencia ha sido muy destructiva y niveles de irradiancia entre estos extremos. En consecuencia, observamos un continuo de valores de irradiancia que tiene la apariencia de "motas", de manera desordenada (10).

Como la interferencia, se produce en todo el espacio ocupado por las ondas reflejadas por la superficie, el speckle ocupa todo el espacio, entre la superficie iluminada y el plano de observación. El patrón de speckle de la propagación de la luz en el espacio libre,

interponiendo una pantalla se conoce como speckle objetivo (ver Figura 2.a), mientras que el estudiado mediante un sistema de formación de imagen como lentes o cámaras CCD se conoce como speckle subjetivo (11) (ver Figura 2.b).

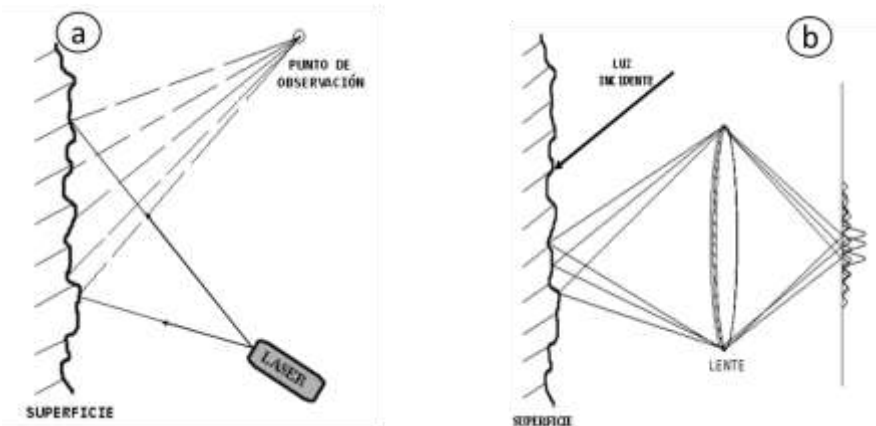


Figura 2 a) Speckle Objetivo y b) Speckle subjetivo (11).

Si bien, el origen del speckle, quizás es más fácil de discutir con la geometría de reflexión, del espacio libre mostrado en la Figura 2.a, con algún trabajo adicional, también se puede explicar con la geometría de la imagen de la Figura 2.b, en donde ahora se debe considerar el fenómeno de difracción. Si se coloca, por ejemplo, una lente convergente frente a la superficie reflectora, esta debe formar una imagen de dicha superficie en el punto de observación. La imagen de cada punto de la superficie iluminada es una imagen de difracción con la forma de un pequeño disco de Airy, vista desde el punto imagen P . Como consecuencia de la rugosidad de la superficie, se produce interferencia entre las imágenes de difracción vecinas, dando como resultado el speckle (12).

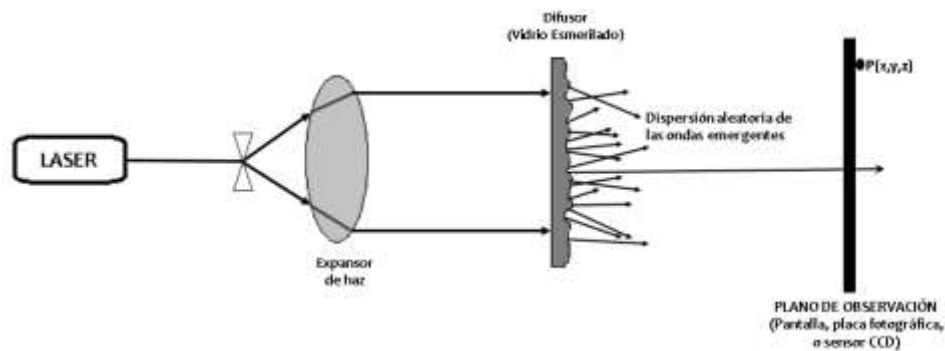


Figura 3 Transmisión de luz coherente a través de un objeto translúcido (12).

La formación del speckle no solo se limita a luz reflejada, sino también a la transmitida a través de algún objeto difusor; si iluminamos con luz coherente, por ejemplo desde la parte posterior de un vidrio esmerilado, tal como se muestra en la Figura 3. La superficie en la que la luz ingresa al difusor, pueden considerarse planas, y las pequeñas curvaturas locales en la superficie de salida rugosas, extienden el campo en ondas esféricas y,

además, las variaciones aleatorias del espesor del vidrio producen las fases aleatorias de las ondas secundarias, obteniéndose así ondas desfasadas pero coherente, y se aplica a estas los mismos principios de speckle objetivo o subjetivo, explicados anteriormente.

Si bien la mayoría de las discusiones en este trabajo, se presentan en términos de las geometrías reflectantes, como en la Figura 2, las conclusiones se aplican igualmente bien a la geometría de transmisión, siempre que el frente de onda transmitido por el difusor satisfaga los mismos supuestos básicos aplicados al frente de onda reflejado por un objeto rugoso (13).

2.2 Propiedades estadísticas de los patrones de Speckle

Debido a que el speckle es un fenómeno aleatorio, solo puede ser descrito y analizado estadísticamente. Muchos investigadores han dedicado esfuerzo al estudio de su naturaleza estadística (8) (12) (14) (15) llegándose a establecer que las mismas están íntimamente conectadas a las características estadísticas del objeto difusor, y al grado de coherencia de la luz que lo produce. Es por esto describiremos desde el punto de vista estadístico, algunas de las características que definen a este fenómeno. Las estadísticas del speckle objetivo y subjetivo son iguales (13).

2.2.1 Estadística de primer Orden

Las estadísticas de primer orden, describen las propiedades del patrón de speckle punto a punto, es decir, las propiedades estadísticas en un punto en el espacio o; para el speckle que varía en el tiempo, las propiedades estadísticas en el espacio-tiempo (8). El patrón de speckle tiene su origen en la interferencia de un gran número de ondas coherentes, que por alguna razón difieren principalmente en su fase, o, aunque menos frecuente, en su amplitud. En esta sección veremos cómo dicho origen reside en la adición de una serie de contribuciones complejas en fase aleatoria, generalmente amplitudes complejas de campos de ondas ópticas, y, por lo tanto, se pueden aplicar sumas fasoriales aleatorias.

2.2.1.1 El speckle como fenómeno de camino aleatorio

Para ayudar en el desarrollo de un modelo estadístico para el speckle, inicialmente hacemos algunas suposiciones simplificadoras. Suponemos que la luz incidente está perfectamente polarizada, es perfectamente monocromática y que la longitud de onda elegida es mucho más pequeña que las variaciones de altura de la superficie rugosa.

Sea $u(x,y,z;t)$ la representación de la señal analítica del campo monocromático y perfectamente polarizado incidente en el punto (x,y,z) y en el instante t :

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}; t) = \mathbf{A}(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}; t) e^{i2\pi vt} \quad (0.1)$$

donde v es la frecuencia óptica y $A(x,y,z)$ es el fasor de amplitud, el cual es una función compleja, que se puede expresar como:

$$\mathbf{A}(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) = |\mathbf{A}_0(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z})| e^{i\theta(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z})} \quad (0.2)$$

de esta ecuación podemos obtener la intensidad, que viene dada por:

$$I(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} |\mathbf{u}(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}; t)|^2 dt = |A(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z})|^2 \quad (0.3)$$

Quizás la propiedad estadística más importante de un patrón de speckle, es la distribución de probabilidad de la intensidad I (13). ¿Qué probabilidad hay de que observemos un pico brillante o un nulo oscuro en la intensidad en un punto dado? Esta pregunta puede responderse observando la similitud del problema en cuestión, con el problema clásico de la caminata aleatoria en matemáticas estadísticas (16), que se ha estudiado durante más de 100 años (17) (18) (19) de la siguiente manera:

La amplitud compleja del campo en (x, y, z) , puede considerarse como el resultado de la suma de las contribuciones de muchas áreas de dispersión elementales en la superficie rugosa y si cada onda coherente es representada por un fasor, la amplitud fasorial $A(x, y, z)$ del campo en la ecuación (0.2) se puede representar como una suma de muchas contribuciones fasoriales elementales $(\sqrt{N})^{-1} \mathbf{a}_k(x, y, z)$, $k=1, 2, \dots, N$:

$$A(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) = \sum_{k=1}^N \frac{1}{\sqrt{N}} \mathbf{a}_k(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) = \sum_{k=1}^N |a_k| e^{i\theta_k} \quad (0.4)$$

donde $|a_k|$ y θ_k representan la amplitud y fase de la contribución de la k -ésima área de dispersión y N es el número total de dichas contribuciones, la Figura 4 ilustra esta adición compleja de las muchas contribuciones fasorial elementales para producir la resultante A .

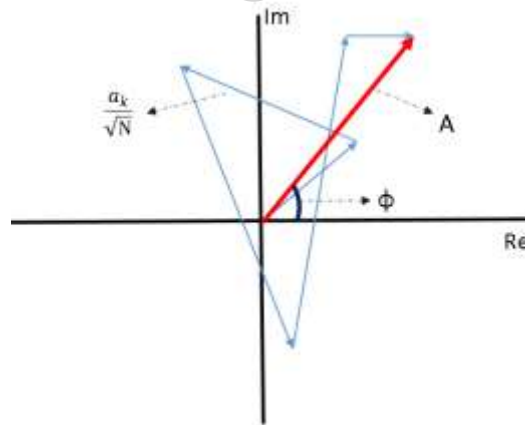


Figura 4 Paseo aleatorio en el plano complejo (15).

Ahora hacemos dos suposiciones importantes sobre las contribuciones de los dispersores elementales:

- I. La amplitud $|a_k|$ y la fase θ_k del k -ésimo fasor elemental son estadísticamente independientes entre sí, de las amplitudes y fases de todos los demás fasores elementales.

- II. Es igualmente probable que las fases θ_k de las contribuciones elementales se encuentren en cualquier lugar del intervalo primario $(-\pi, \pi)$ (Es decir, la superficie es rugosa en comparación con una longitud de onda y todos los valores de fase son igualmente probables).

Con estos dos supuestos, la similitud de nuestro problema, con el clásico paseo aleatorio en un plano se vuelve completa y podemos aplicar los resultados ya obtenidos (13), para encontrar respuesta a nuestra pregunta e investigar las propiedades estadísticas del campo resultante en lo que sigue.

2.2.1.2 Estadísticas de la amplitud compleja

Las partes reales e imaginarias del campo resultante vienen dadas por:

$$\begin{aligned} A^{(r)} &= \text{Re}\{A\} = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| \cos \phi_k \\ A^{(i)} &= \text{Im}\{A\} = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| \sen \phi_k \end{aligned} \quad (0.5)$$

Los valores medios de $A^{(r)}$ y $A^{(i)}$ son:

$$\begin{aligned} \langle A^{(r)} \rangle &= \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N \langle |a_k| \cos \phi_k \rangle = \sum_{k=1}^N \langle |a_k| \rangle \langle \cos \phi_k \rangle = 0 \\ \langle A^{(i)} \rangle &= \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N \langle |a_k| \sen \phi_k \rangle = \sum_{k=1}^N \langle |a_k| \rangle \langle \sen \phi_k \rangle = 0 \end{aligned} \quad (0.6)$$

Donde la suposición *i* anterior se utiliza para promediar sobre $|a_k|$ y ϕ_k separadamente, y la suposición *ii* asegura un valor de cero para $\langle \cos \phi_k \rangle$ y $\langle \sen \phi_k \rangle$. De manera similar, las varianzas:

$$\begin{aligned} \langle [A^{(r)}]^2 \rangle &= \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle |a_k| |a_m| \rangle \langle \cos \phi_k \cos \phi_m \rangle \\ &= \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |a_k|^2 \rangle}{2} \\ \langle [A^{(i)}]^2 \rangle &= \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle |a_k| |a_m| \rangle \langle \sen \phi_k \sen \phi_m \rangle \\ &= \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |a_k|^2 \rangle}{2} \\ \langle A^{(r)} A^{(i)} \rangle &= \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \langle |a_k| |a_m| \rangle \langle \cos \phi_k \sen \phi_m \rangle = 0 \end{aligned} \quad (0.7)$$

Donde hemos utilizado el hecho de que, para las fases independientes y uniformemente distribuidas:

$$\langle \cos \phi_k \cos \phi_m \rangle = \langle \sen \phi_k \sen \phi_m \rangle = \begin{cases} 1/2, & k = m \\ 0, & k \neq m \end{cases} \quad (0.8)$$

$$\langle \cos \phi_k \sen \phi_m \rangle = 0$$

Entonces vemos que las partes real e imaginaria del campo complejo tienen cero medias, idénticas varianzas y no están correlacionadas (14).

Ahora suponemos, tal como suele suceder en la práctica, que el número N de contribuciones fasoriales elementales, es extremadamente grande. Por lo tanto, las partes real e imaginaria se expresan mediante la ecuación (0.5), como sumas de un gran número de variables aleatorias independientes. En este punto se puede aplicar el teorema del límite central (20). Según este, como $N \rightarrow \infty$, $A^{(r)}$ y $A^{(i)}$ son asintóticamente gaussianas. Combinando este hecho con los resultados obtenidos en (0.5) y (0.6), se encuentra que la función de densidad de probabilidad conjuntas de las partes real e imaginaria del campo se aproximan asintóticamente.

$$p_{r,i}(A^{(r)}, A^{(i)}) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left\{-\frac{[A^{(r)}]^2 + [A^{(i)}]^2}{2\sigma^2}\right\} \quad (0.9)$$

Donde:

$$\sigma^2 = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{\langle |a_k|^2 \rangle}{2} \quad (0.10)$$

Esta función de densidad, se conoce como función de densidad circular de Gauss, ya que los contornos de densidad de probabilidad constante son circulares y se dice entonces que este faser A complejo resultante es una variable gaussiana compleja circular.

2.2.1.3 Estadística de intensidad y fase

En la mayoría de los experimentos que involucran la región óptica del espectro, es la intensidad de la luz lo que se mide directamente. Es por esto que, a partir de las estadísticas conocidas de la amplitud compleja, queremos encontrar las propiedades estadísticas, de la intensidad de un patrón de speckle polarizado y como un subproducto de este análisis, podemos encontrar también las estadísticas de la fase.

La intensidad I y la fase ϑ del campo resultante están relacionadas con las partes reales e imaginarias de la amplitud compleja mediante la transformación:

$$\begin{aligned} A^{(r)} &= \sqrt{I} \cos \theta \\ A^{(i)} &= \sqrt{I} \sen \theta \end{aligned} \quad (0.11)$$

O de manera equivalente por:

$$I = [A^{(r)}]^2 + [A^{(i)}]^2$$

$$\theta = \tan^{-1} \frac{A^{(i)}}{A^{(r)}} \quad (0.12)$$

Aplicando las técnicas habituales para las transformaciones de las variables aleatorias (21), encontramos las funciones conjuntas de densidad de probabilidad de I y θ :

$$p_{I,\theta}(I, \theta) = p_{r,i}(\sqrt{I} \cos \theta, \sqrt{I} \sin \theta) ||J|| \quad (0.13)$$

Donde J es el Jacobiano de la transformación:

$$||J|| = \left\| \begin{array}{cc} \frac{\partial A^{(r)}}{\partial I} & \frac{\partial A^{(r)}}{\partial \theta} \\ \frac{\partial A^{(i)}}{\partial I} & \frac{\partial A^{(i)}}{\partial \theta} \end{array} \right\| = \frac{1}{2} \quad (0.14)$$

Sustituyendo ecuación (0.9) en (0.13), encontramos:

$$p_{I,\theta}(I, \theta) = \begin{cases} \frac{1}{4\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{I}{2\sigma^2}\right), & I \geq 0. \\ 0, & \text{si no.} \end{cases} \quad (0.15)$$

La función de densidad de probabilidad marginal de la intensidad sola para I y θ vienen dadas por:

$$p_I(I) = \int_{-\pi}^{\pi} p_{I,\theta}(I, \theta) d\theta = \begin{cases} \frac{1}{2\sigma^2} \exp\left(-\frac{I}{2\sigma^2}\right), & I \geq 0 \\ 0, & \text{si no.} \end{cases} \quad (0.16)$$

$$p_{\theta}(\theta) = \int_{-\pi}^{\pi} p_{I,\theta}(I, \theta) dI = \begin{cases} \frac{1}{2\pi}, & -\pi \leq \theta < \pi \\ 0, & \text{si no} \end{cases} \quad (0.17)$$

La ecuación (0.16) muestra que la probabilidad de encontrar un valor de intensidad en un punto $P(x,y,z)$, dado en el espacio en un patrón moteado polarizado viene dada por una distribución exponencial negativa, que es independiente del ángulo y la ecuación (0.17), la fase se describe mediante una estadística uniforme. Cabe destacar también que:

$$p_{I,\theta}(I, \theta) = p_I(I) p_{\theta}(\theta) \quad (0.18)$$

Por lo tanto, la intensidad y la fase son estadísticamente independientes en un punto dado. Como la intensidad es la cantidad de interés primario, investigaremos sus

propiedades estadísticas con más detalle. El n -ésimo momento de intensidad se muestra fácilmente como:

$$\langle I^n \rangle = n! (2\sigma^2)^n = n! \langle I \rangle^n \quad (0.19)$$

Para $n=1$, obtenemos que el valor medio de I , $\langle I \rangle = 2\sigma^2$. Y el segundo momento y la varianza vienen dados por:

$$\begin{aligned} \langle I^2 \rangle &= 2\langle I \rangle^2 \\ \sigma_I^2 &= \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 = \langle I \rangle^2 \end{aligned} \quad (0.20)$$

Por lo tanto la desviación estándar σ_I de un patrón de speckle polarizado, es igual a la media de la intensidad. Una vez teniendo en cuenta estos resultados podemos escribir ecuación (0.16) como:

$$p_I(I) = \int_{-\pi}^{\pi} p_{I,\theta}(I, \theta) d\theta = \frac{1}{\langle I \rangle} \exp\left(-\frac{I}{\langle I \rangle}\right), I \geq 0 \quad (0.21)$$

En la práctica, se suele interesar principalmente en la probabilidad $P(I)$, de que la intensidad supere un umbral I_u . En el presente caso encontramos que:

$$P(I > I_u) = \int_{I_u}^{\infty} p_I(I) dI = \frac{1}{\langle I \rangle} \int_{I_u}^{\infty} \exp\left(-\frac{I}{\langle I \rangle}\right) dI = \exp\left(-\frac{I_u}{\langle I \rangle}\right) \quad (0.22)$$

La Figura 5 muestra la función densidad de probabilidad normalizada $\langle I \rangle p_I(I)$. Igualmente representa la probabilidad $P(I)$ que la intensidad exceda el umbral I_u . Se puede observar que los valores típicos de intensidad se encuentran en el intervalo efectivo $0 \leq I \leq 2\langle I \rangle$. De hecho, la probabilidad de encontrar valores de intensidad mayores que $5\langle I \rangle$ es prácticamente nula, de hecho $P(I > 5\langle I \rangle) = 0.005$ y $P(0 \leq I \leq 2\langle I \rangle) = 0.87$. Por otra parte que $I_{min} = 0$ y que $P(I_{min})$ tenga el máximo valor implica que la visibilidad del patrón es igual a uno y por lo tanto, que los puntos brillantes serán perfectamente diferenciables sobre un fondo oscuro.

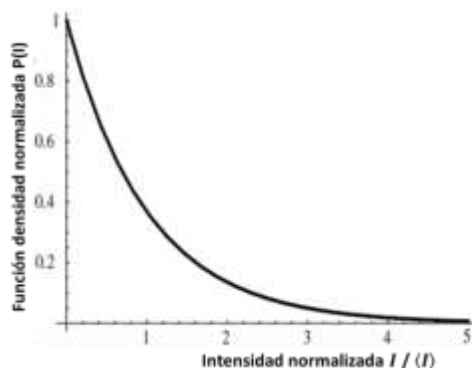


Figura 5 Función densidad de probabilidad de intensidad de un patrón de speckle (14).

Una medida habitual del grado de modulación de un patrón de speckle, se denomina contraste y viene definido por:

$$C = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle} \quad (0.23)$$

Por tanto, para un patrón de speckle polarizado, su contraste es igual a 1. Si el contraste del speckle es 1, en principio no es posible extraer información de esta cantidad estadística. Sin embargo, los procesos que ocurren dentro de un medio cambiarán la distribución de probabilidad, cambiando los valores del contraste del patrón de speckle.

Por último y para uso posterior definimos la función característica, la cual es la transformada de Fourier de la función densidad de probabilidad (con signo contrario), dada por:

$$M_I(iv) = \langle e^{ivI} \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} e^{ivI} p_I(I) dI = \frac{1}{1 - iv\langle I \rangle} \quad (0.24)$$

2.2.2 Estadísticas de primer orden de sumas de patrones de speckle

Experimentalmente, la intensidad medida en un punto del espacio, se puede considerar como resultado de la suma de dos o más patrones de speckle polarizado. Tal es el caso, por ejemplo, cuando la superficie rugosa despolariza parcialmente la luz dispersa, o cuando el haz de iluminación contiene dos o más frecuencias ópticas diferentes. Goodman (13) desarrolló un formalismo general, mediante el cual se estudia las propiedades estadísticas de la suma de N patrones de speckle parcialmente correlacionados, usando la técnica de la matriz de coherencia, que describiremos más adelante. Los patrones de speckle pueden, en principio, sumarse en base a la amplitud o intensidad tal como se describe a continuación.

2.2.2.1 Suma de patrones de speckle según la amplitud

Siguiendo la asunción de luz monocromática y perfectamente polarizada. Sea el campo complejo $A(x, y, z)$ el resultado de suma de N patrones de speckle diferentes, sobre una base de amplitud que viene dada por:

$$A = \sum_{k=1}^N A_k \quad (0.25)$$

Los campos de componentes individuales A_k , que son patrones de speckle, son variables aleatorias gaussianas complejas circulares, de media cero. La correlación existente entre los campos k -ésimo y l -ésimo es descrita por el promedio del conjunto $\langle A_k A_l^* \rangle$.

Para especificar las estadísticas de A , observamos que su parte real (o imaginaria), es una suma de variables aleatorias gaussianas (generalmente correlacionadas), es decir, las partes reales (o imaginarias) de los campos componentes A_k , dado que la suma de cualquier número de variables aleatorias gaussianas de valor real (correlacionadas o no)

es gaussiana, concluimos que las partes real e imaginaria del campo total A son variables aleatorias gaussianas. Además, dado que las partes real e imaginaria de cada campo componente A_k tienen medias cero, también las partes real e imaginaria del campo total A .

Hemos mostrado que A tiene partes reales e imaginarias que son variables aleatorias gaussianas de media cero. Sin embargo, todavía no podemos concluir que A sea una variable aleatoria gaussiana compleja circular, porque debemos demostrar que sus partes real e imaginaria tienen varianzas iguales y no están correlacionadas. Este resulta ser el caso, siempre que la condición:

$$\langle A_k A_l \rangle = 0, \quad \forall k, l \quad (0.26)$$

Se cumpla y como aun los campos se pueden correlacionar debido a que $\langle A_k A_l^* \rangle \neq 0$, podemos concluir entonces que el campo total A es una variable aleatoria gaussiana compleja circular. De aquí que la intensidad $I = |A|^2$ obedezca a estadísticas exponenciales negativas, al igual que las intensidades de los patrones de speckle componentes. Esto nos lleva a la importante conclusión de que la suma de patrones de speckle en base a la amplitud no cambia las estadísticas de intensidad, aparte de una constante de escala.

2.2.2.2 Suma de patrones de speckle según la intensidad

Sea la intensidad total I compuesta por una suma de N patrones de speckle:

$$I = \sum_{k=1}^N I_k \quad (0.27)$$

Donde ya sabemos que $I = |A|^2$ e $I_k = |A_k|^2$. Las correlaciones entre los N componentes de intensidad se pueden expresar como coeficientes de correlación:

$$c_{kl} = \frac{\langle I_k I_l \rangle - \langle I_k \rangle \langle I_l \rangle}{[\langle (I_k - \langle I_k \rangle)^2 \rangle \langle (I_l - \langle I_l \rangle)^2 \rangle]^{1/2}} \quad k, l = 1, \dots, N. \quad (0.28)$$

Tales correlaciones, surgen de las correlaciones entre los campos subyacentes, que dan lugar a estas intensidades. En este punto surge una pregunta fundamental a saber, ¿existe una transformación de los N campos A_k que preserve la intensidad total I , pero elimine la correlación entre los diversos componentes del campo, posiblemente cambiando sus intensidades I_k individuales en el proceso? Goodman (14) demostró que sí.

Resumiendo el desarrollo matemático, estas correlaciones, entre los N campos pueden expresarse de una forma más compacta a través de una matriz Hermítica, cuyos autovalores denotamos por $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_N$, que luego de varias manipulaciones y transformaciones lineal, define N nuevos campos componentes A'_1, A'_2, \dots, A'_N , que no están correlacionados y que se suman sobre una base de intensidad para producir la

misma intensidad total que estaba presente antes de la transformación, es decir, pudo transformar los N campos complejos circulares de Gauss correlacionados de los patrones de speckle originales, en N campos complejos circulares de Gauss no correlacionados que representan nuevos patrones de speckle y que tienen la misma intensidad media sumada. Esto es:

$$\mathbf{I} = \sum_{k=1}^N |A'_k|^2 = \sum_{k=1}^N |A_k|^2 \quad (0.29)$$

Si la condición (0.25) se satisface de nuevo, como en todos los casos prácticos conocidos por el autor (14), los campos A'_k son variables aleatorias complejas circulares de media cero y se deduce que las intensidades $I'_k = |A'_k|^2$, son estadísticamente independientes y que, cada una obedece a una distribución exponencial negativa con valor medio λ_k , y entonces podemos aplicar los resultados ya conocidos, por lo tanto:

$$p_{I'_k}(I'_k) = \begin{cases} \frac{1}{\lambda_k} \exp\left(-\frac{I'_k}{\lambda_k}\right), & I'_k \geq 0 \\ 0, & \text{si no.} \end{cases} \quad (0.30)$$

Para encontrar la función de densidad de probabilidad de la intensidad total I , observamos que su función característica, debe ser igual al producto de las funciones características $M_k(iv)$ de las variables aleatorias I'_k . Usando la ecuación (0.24), tenemos:

$$M_I(iv) = \prod_{k=1}^N (1 - iv\lambda_k)^{-1} \quad (0.31)$$

La forma de la función de densidad de probabilidad correspondiente de la intensidad total depende de si los valores propios λ_k son distintos o si existe alguna degeneración. Si existen N valores propios distintos de cero, entonces tenemos:

$$p_I(I) = \begin{cases} \sum_{k=1}^N \frac{\lambda_k^{N-2}}{\prod_{\substack{p=1 \\ p \neq k}}^N (\lambda_k - \lambda_p)} \exp\left(-\frac{I}{\lambda_k}\right), & I \geq 0 \\ 0, & \text{si no.} \end{cases} \quad (0.32)$$

expresando así la función de densidad, como una suma de exponenciales decrecientes simples. Si, en cambio, existen N autovalores distintos de cero, todos los cuales son iguales al valor único λ_0 , el resultado es:

$$p_I(I) = \begin{cases} \frac{I^{N-1}}{(N-1)! \lambda_0^N} \exp\left(-\frac{I}{\lambda_k}\right), & I \geq 0 \\ 0, & \text{si no.} \end{cases} \quad (0.33)$$

Como ejemplo, analicemos la suma de dos patrones de speckle. La función de densidad de probabilidad viene dada por:

$$p_I(I) = \frac{\exp\left(-\frac{I}{\lambda_1}\right)}{\lambda_1 - \lambda_2} - \frac{\exp\left(-\frac{I}{\lambda_2}\right)}{\lambda_1 - \lambda_2}, \quad \lambda_1 \neq \lambda_2 \quad (0.34)$$

O bien

$$p_I(I) = \frac{\exp\left(-\frac{I}{\lambda_0}\right)}{\lambda_0}, \quad \lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_0 \quad (0.35)$$

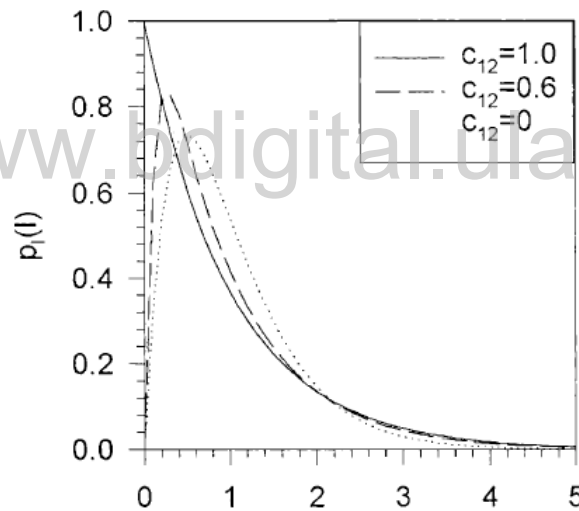


Figura 6 Funciones densidad de probabilidad para intensidad de la suma de dos patrones de speckle (14).

La Figura 6 muestra las funciones de densidad de probabilidad, de la suma de dos patrones de speckle, para los casos particulares en que los coeficientes de correlación de intensidad son: $c_{12} = 0$ ($\lambda_1 = \lambda_2 = 0.5$), $c_{12} = 0,6$ ($\lambda_1 = 0,887$; $\lambda_2 = 0,113$) y $c_{12} = 1,0$ ($\lambda_1 = 1$; $\lambda_2 = 0$) y suponiendo que las intensidades medias son iguales $\langle I_1 \rangle = \langle I_2 \rangle$.

El n-ésimo momento de la intensidad resultante viene dado por:

$$\langle I^n \rangle = n! \frac{\lambda_1^{n+1} - \lambda_2^{n+1}}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (0.36)$$

Si la intensidad media toma el valor de la unidad, $\langle I \rangle = \lambda_1 + \lambda_2 = 1$. El contraste definido en la ecuación (0.23), asociado al patrón de speckle resultante viene dado por:

$$C = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle} = [2\lambda_1^2 - 2\lambda_1 + 1]^{1/2} \quad (0.37)$$

cuya gráfica se muestra en la Figura 7. Se observa que C toma un valor mínimo $\frac{1}{\sqrt{2}}$ cuando $\lambda_1 = \lambda_2 = 0.5$, y tiene el valor máximo $C = 1$, cuando $\lambda_1 = 0$ (entonces $\lambda_2 = 1$) y cuando $\lambda_1 = 1$ ($\lambda_2 = 0$), es el caso para cuando hay un único patrón de speckle.

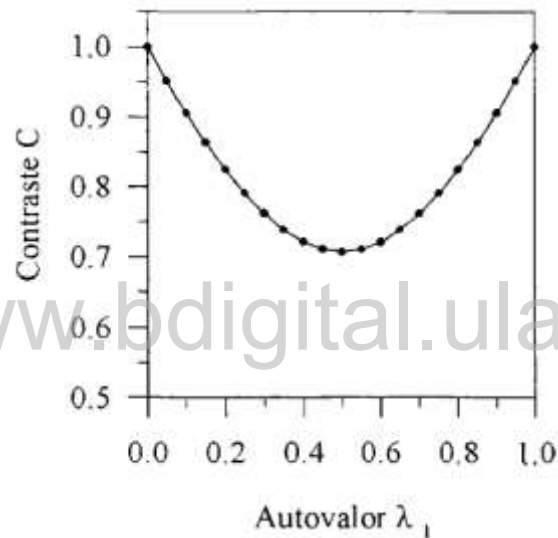


Figura 7 Contraste para la suma de dos patrones de speckle.

En general, el contraste asociado a la suma de N patrones de speckle, adquiere un valor mínimo de $C = \frac{1}{\sqrt{N}}$ cuando: $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_N = N^{-1}$.

2.2.3 Estadísticas de segundo orden

Las estadísticas de segundo orden, nos permiten estudiar la estructura espacial detallada de los granos del patrón y de su distribución en él, así como también las propiedades físicas que influyen en los tamaños de escala que los granos presentan, esto a través de la relación entre dos puntos distintos en el plano de observación, dicha relación depende del esquema óptico utilizado, ya sea el de libre propagación (speckle objetivo) o el de formación de imagen (speckle subjetivo). Goldfisher (22) y Goodman (1) fueron los primeros en publicar las estadísticas de segundo orden que se basan, tal como veremos a continuación, en la función de autocorrelación y la densidad espectral de potencia (espectro de Winner).

2.2.3.1 Función de autocorrelación y densidad espectral de potencia Geometría del espacio libre

Siguiendo al desarrollo hecho por Goodman, sea la geometría de propagación del espacio tal como se muestra en la Figura 8, el haz monocromático incidente, es dispersado por la superficie rugosa. Dicho campos de dispersión pueden describirse en un plano inmediatamente adyacente a esa superficie, por la función de valor complejo dada por $a(\xi, \eta)$ que por simplicidad, representa un componente de polarización lineal del campo eléctrico. El campo complejo $A(x, y)$, observado a través de un plano paralelo al plano (ξ, η) y a una distancia z del mismo, representa el campo speckle de interés. Los resultados se aplican igualmente al caso de la transmisión a través de un difusor (10).

Deseamos calcular la función de autocorrelación de la distribución de intensidad $I(x, y) = |A(x, y)|^2$ en el plano (x, y) (entre dos puntos x_1, y_1 y x_2, y_2) mediante la función de autocorrelación, que se define como:

$$R_I(x_1, y_1; x_2, y_2) = \langle I(x_1, y_1)I(x_2, y_2) \rangle \quad (0.38)$$

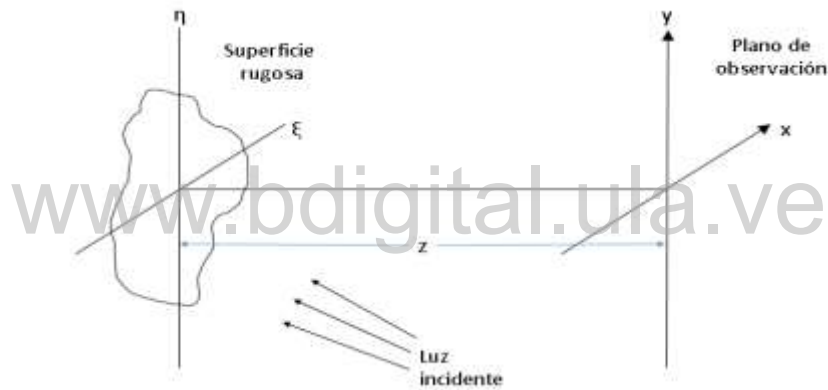


Figura 8 Geometría de propagación libre para la formación de speckle (10).

Donde, el término de la derecha representa un promedio sobre un conjunto de superficies rugosas. El ancho de esta función de autocorrelación proporciona una medida razonable del "ancho promedio" de un grano del speckle. Para calcular, utilizaremos el hecho de que como la superficie es rugosa es comparación con la longitud de onda, el campo $A(x, y)$ es una variable aleatoria gaussiana compleja circular en cada punto (x, y) . Para tales campos la función de autocorrelación de la intensidad se puede expresar, en términos de la función de autocorrelación de los campos, dada por:

$$J_A(x_1, y_1; x_2, y_2) = \langle A(x_1, y_1)A^*(x_2, y_2) \rangle \quad (0.39)$$

Que se define como intensidad mutua del campo en terminología de la teoría de coherencias (23). Para campos gaussianos complejos circulares la relación entre R_I y J_A viene dada por:

$$R_I(x_1, y_1; x_2, y_2) = \langle I(x_1, y_1)I(x_2, y_2) \rangle + |J_A(x_1, y_1; x_2, y_2)|^2 \quad (0.40)$$

Observamos que calcular R_I , se reduce a calcular la intensidad mutua J_A , esto se obtiene de la relación entre el campo $a(\xi, \eta)$ en la superficie difusora y $A(x, y)$ en el plano de observación, mediante el principio de Huygens-Fresnel, expresado en la aproximación de Fresnel (24) como:

$$A(x, y) = \frac{1}{\lambda z} \exp \left[-i \frac{\pi}{\lambda z} (x^2 + y^2) \right] \iint_{-\infty}^{\infty} a(\xi, \eta) \exp \left[-i \frac{\pi}{\lambda z} (\xi^2 + \eta^2) \right] \exp \left[-i \frac{2\pi}{\lambda z} (x\xi + y\eta) \right] d\xi d\eta \quad (0.39)$$

La sustitución de esta expresión en ecuación (0.39) da como resultado la relación entre la intensidad mutua J_A en la región de observación y la intensidad mutua J_α en el plano de dispersión:

$$J_A(x_1, y_1; x_2, y_2) = \frac{1}{\lambda^2 z^2} \exp \left[-i \frac{\pi}{\lambda z} (x_1^2 - x_2^2 + y_1^2 - y_2^2) \right] \iiint J_\alpha(\xi_1, \eta_1; \xi_2, \eta_2) \exp \left[-i \frac{\pi}{\lambda z} (\xi_1^2 - \xi_2^2 + \eta_1^2 - \eta_2^2) \right] \exp \left[-i \frac{2\pi}{\lambda z} (x_1 \xi_1 + y_1 \eta_1 - x_2 \xi_2 - y_2 \eta_2) \right] d\xi_1 d\eta_1 d\xi_2 d\eta_2 \quad (0.40)$$

Donde J_α , es la función de correlación de los campos inmediatamente a la derecha de la superficie de dispersión, la cual está determinada en parte por la función de correlación superficie-altura y en parte por la longitud de onda finita de la luz. Asumiremos que la extensión de correlación del campo de ondas $J_\alpha(\xi, \eta)$, es lo suficientemente pequeña como para que pueda ser representada adecuadamente por una función delta, esto es:

$$J_\alpha(\xi_1, \eta_1; \xi_2, \eta_2) \simeq k P(\xi_1, \eta_1) P^*(\xi_2, \eta_2) \delta(\xi_1 - \xi_2, \eta_1 - \eta_2) \quad (0.41)$$

Donde k es una constante de proporcionalidad, $P(\xi, \eta)$ es la amplitud del campo incidente en el punto de dispersión (intensidad de la luz justo a la derecha de la superficie de dispersión) y $\delta(\xi, \eta)$ es una función delta bidimensional. Como solo nos interesa el módulo de J_A podemos descartar los exponenciales complejos de fase cuadrática que preceden a la integral en la ecuación 2.40, con esto asumido, la ecuación (0.40) nos queda:

$$J_A(\Delta x; \Delta y) = \frac{k}{\lambda^2 z^2} \iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 \exp \left\{ i \frac{2\pi}{\lambda z} [\xi \Delta x + \eta \Delta y] \right\} d\xi d\eta \quad (0.42)$$

Donde $\Delta x = x_1 - x_2$ y $\Delta y = y_1 - y_2$, y hemos reemplazado (ξ_1, η_1) por simplemente (ξ, η) . Tenemos entonces que J_A depende en su mayoría de la diferencia en el plano de

coordenadas (x, y) , por unas constantes multiplicativas y por la transformada de Fourier de la distribución de intensidad $|P(\xi_1, \eta_1)|^2$ que sale del punto de dispersión.

En la mayoría de los casos, es conveniente tratar con la intensidad mutua normalizada (14), conocida como factor complejo de coherencia:

$$\mu_A = \frac{J_A(x_1, y_1; x_2, y_2)}{[J_A(x_1, y_1; x_1, y_1)J_A(x_2, y_2; x_2, y_2)]^{1/2}} \quad (0.43)$$

Esto es,

$$\mu_A = \frac{\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 \exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda z} (\xi \Delta x + \eta \Delta y) \right] d\xi d\eta}{\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 d\xi d\eta} \quad (0.44)$$

Y la función de autocorrelación de la intensidad de speckle R_I toma la forma:

$$R_I(\Delta x; \Delta y) = \langle I \rangle^2 [1 + |\mu_A(\Delta x; \Delta y)|^2] \quad (0.45)$$

$$R_I(\Delta x; \Delta y) = \langle I \rangle^2 \left[1 + \left| \frac{\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 \exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda z} (\xi \Delta x + \eta \Delta y) \right] d\xi d\eta}{\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 d\xi d\eta} \right|^2 \right] \quad (0.46)$$

Obtenido este resultado, desarrollemos ahora el tamaño "promedio" de un speckle. Utilizando el área equivalente de la función de covarianza normalizada de la intensidad de speckle (25), llamada área de correlación o área de coherencia denotada por \mathcal{A}_c . La función de covarianza normalizada de la intensidad del speckle, está relacionada con la función de autocorrelación de la intensidad R_I de la siguiente forma:

$$c_I(\Delta x; \Delta y) = \frac{R_I(\Delta x; \Delta y) - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} \quad (0.47)$$

Luego, el área de correlación está dada por:

$$\begin{aligned} \mathcal{A}_c &= \iint_{-\infty}^{\infty} c_I(\Delta x; \Delta y) d\Delta x d\Delta y \\ &= \iint_{-\infty}^{\infty} |\mu_A(\Delta x; \Delta y)|^2 d\Delta x d\Delta y = (\lambda z)^2 \frac{\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 d\xi d\eta}{[\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 d\xi d\eta]^2} \end{aligned} \quad (0.48)$$

Ilustremos este resultado con un par de ejemplos. Sea un punto de dispersión cuadrado de lados $L \times L$ de intensidad uniforme, esto es:

$$|P(\xi, \eta)|^2 = |P_0(\xi, \eta)|^2 \text{rect} \frac{\xi}{L} \text{rect} \frac{\eta}{L} \quad (0.49)$$

Donde la función rectángulo $rect(x)$ es igual a 1 para $|x| \leq 1/2$, cero en otro caso. La transformada de Fourier de esta función es:

$$\begin{aligned} \iint_{-\infty}^{\infty} |P_0(\xi, \eta)|^2 rect\left(\frac{\xi}{L}\right) rect\left(\frac{\eta}{L}\right) \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda z}(\xi\Delta x + \eta\Delta y)\right] d\xi d\eta \\ = L^2 |P_0(\xi, \eta)|^2 sinc\left(\frac{L\Delta x}{\lambda z}\right) sinc\left(\frac{L\Delta y}{\lambda z}\right) \end{aligned} \quad (0.50)$$

Donde $sinc = \frac{\sin \pi x}{\pi x}$, se sigue que la función de autocorrelación de la intensidad de speckle es:

$$R_I(\Delta x; \Delta y) = \langle I \rangle^2 \left[1 + sinc^2\left(\frac{L\Delta x}{\lambda z}\right) sinc^2\left(\frac{L\Delta y}{\lambda z}\right) \right] \quad (0.51)$$

El área correlacionada es:

$$\begin{aligned} \mathcal{A}_c &= (\lambda z)^2 \frac{\iint_{-\infty}^{\infty} L^2 |P_0(\xi, \eta)|^2 sinc\left(\frac{L\Delta x}{\lambda z}\right) sinc\left(\frac{L\Delta y}{\lambda z}\right) d\xi d\eta}{\left[\iint_{-\infty}^{\infty} L^2 |P_0(\xi, \eta)|^2 sinc\left(\frac{L\Delta x}{\lambda z}\right) sinc\left(\frac{L\Delta y}{\lambda z}\right) d\xi d\eta\right]^2} \\ &= (\lambda z)^2 \frac{L^2}{L^4} = \frac{(\lambda z)^2}{L^2} = \frac{(\lambda z)^2}{A} = \frac{\lambda^2}{\Omega_s} \end{aligned} \quad (0.52)$$

Donde A es el área de dispersión y Ω_s el ángulo sólido subtendido de ese punto, visto desde el plano imagen.

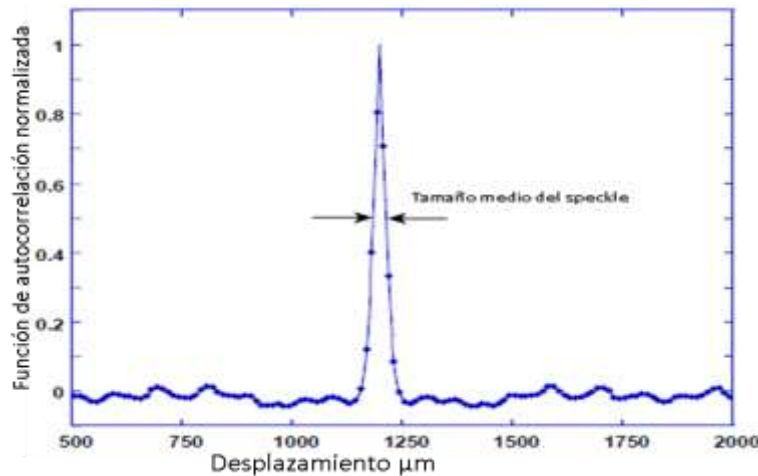


Figura 9 Tamaño de motas promedio calculado por el método de autocorrelación (26).

Dado que la geometría es fundamentalmente bidimensional (ver Figura 9), no hay una forma única de definir la anchura unidimensional de un solo grano, pero una aproximación razonable es simplemente la raíz cuadrada del área de coherencia comentada anteriormente, para este ejemplo en cuestión, esto es:

$$\delta_x \cong \frac{\lambda z}{L} \quad (0.53)$$

Suponga ahora una distribución circular con diámetro D uniforme de intensidad en el punto de dispersión, esto es:

$$|P(\xi, \eta)|^2 = |P_0(\Omega)|^2 = \text{circ}\left(\frac{2\Omega}{D}\right), \quad (0.54)$$

donde $\Omega = \sqrt{\xi^2 + \eta^2}$ y la función $\text{circ}(\Omega)$ es igual a Ω si $\Omega \leq 1$ y cero si no. Para calcular la función de autocorrelación de la función de la intensidad del speckle, realizamos primero la transformada de Fourier al punto circular:

$$\begin{aligned} & \iint_{-\infty}^{\infty} \text{circ}\left(\frac{2\Omega}{D}\right) \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda z}(\xi\Delta x + \eta\Delta y)\right] d\xi d\eta \\ &= 2\pi \int_0^{D/2} \Omega J_0\left(2\pi\frac{r\Omega}{\lambda z}\right) d\Omega = A\left[2\frac{J_1\left(2\frac{\pi D}{\lambda z}r\right)}{\frac{\pi D}{\lambda z}r}\right] \end{aligned} \quad (0.55)$$

Donde $A = \pi\left(\frac{D}{2}\right)^2$ es el área del punto de dispersión, J_1 es una función de Bessel del primer tipo, orden 1, y $r = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}$. Realizando los cálculos apropiados para la normalización (15), la función de autocorrelación de la función de la intensidad del speckle nos queda:

$$R_I(\Delta x; \Delta y) = \langle I \rangle^2 \left[1 + \left| 2\frac{J_1\left(2\frac{\pi D}{\lambda z}r\right)}{\frac{\pi D}{\lambda z}r} \right|^2 \right] \quad (0.56)$$

Luego el área de coherencia viene dada por:

$$\mathcal{A}_c = \frac{\lambda^2}{\Omega_s} \quad (0.57)$$

De estos resultados podemos concluir, que el tamaño promedio transversal de un speckle depende de la distancia del objeto iluminado a la posición de observación, de la longitud de onda dispersada y de la geometría del área iluminada.

Por último, otra cantidad de importancia es la densidad espectral de potencia, que como veremos más adelante es utilizada en los métodos de análisis de los patrones de speckle. Se obtiene al aplicar la transformada de Fourier sobre la función de autocorrelación tal como indica el teorema de Wiener-Khintchine. Fue calculada por primera vez por Goldfischer (22).

Aplicando la transformada de Fourier a la ecuación (0.46) obtenemos

$$G_I = \langle I \rangle^2 \left\{ \frac{\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 |P(\xi - \lambda z v_x, \eta - \lambda z v_y)|^2}{[\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 d\xi d\eta]^2} \right\} \quad (0.58)$$

Geometría de formación de imagen

Cuando el patrón de speckle en estudio, es formado bajo la geometría de formación de imágenes, se deben hacer unas modificaciones a los resultados encontrados anteriormente. Existen diferentes métodos (27) (28), en el presente trabajo seguiremos el realizado por Zernike (28). Supongamos una superficie uniformemente reflectante (o transmisiva) y cuya región uniformemente iluminada i) es grande en comparación con el área de correlación del frente de onda reflejada desde la superficie y ii) sea amplia en comparación con la celda de resolución asociada con la lente utilizada. Lo primero garantiza, que el frente de onda que incide en la apertura de la lente, tiene variaciones de fase, que se distribuyen aproximadamente de manera uniforme en 2π radianes, debido a la interferencia de muchas contribuciones de fase aleatoria, procedentes de una gran cantidad de áreas de correlación de la superficie, y la segunda que el tamaño de los granos de speckle, que inciden en la pupila de la lente es extremadamente pequeño en comparación con el diámetro de esa pupila.

De esto se deduce que para una buena aproximación, la intensidad mutua de los campos en la pupila de la lente viene dada por (0.41), donde ahora el sistema de coordenadas (ξ, η) se encuentra en el plano de la pupila (ver la Figura 10) y $P(\xi, \eta)$ es la función de la pupila de la lente. Con estas nuevas interpretaciones podemos tratar el plano de la pupila, como si fuese una superficie uniformemente brillante, y calculamos la función de autocorrelación del speckle que da como resultado en el plano de la imagen.

De acuerdo con (0.51), la función de autocorrelación del patrón de intensidad del speckle, consiste en un término constante más el módulo al cuadrado de la transformada de Fourier normalizada de la transmitancia de intensidad $|P(\xi, \eta)|^2$ de la pupila del lente y es, además, independiente de las aberraciones que puedan estar asociadas al sistema de imagen, ya que las aberraciones solo afectan la fase de $P(\xi, \eta)$.



Figura 10 Geometría de formación de imagen para la formación de speckle (28).

Sea una lente circular de diámetro D que se encuentra a una distancia z_0 de la superficie iluminada y a su vez a una distancia z_i del plano de observación, tal como se muestra en la Figura 10. La función de autocorrelación del patrón de intensidad del speckle, viene dada por la misma del ejemplo de una superficie circular de diámetro D , iluminada de manera uniforme estudiada anteriormente, solo que ahora sustituimos la distancia z por z_i :

$$R_I(\Delta x; \Delta y) = \langle I \rangle^2 \left[1 + \left| 2 \frac{J_1 \left(2 \frac{\pi D}{\lambda z_i} r \right)}{\frac{\pi D}{\lambda z_i} r} \right|^2 \right] \quad (0.59)$$

Donde $r = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}$ y J_1 es la función de Bessel de orden 1.

Y el tamaño promedio de un grano de speckle viene dado por:

$$\delta_x \cong 1,13 \frac{\lambda z_i}{D} \quad (0.60)$$

El tamaño de la imagen del speckle en un sistema de formación de imagen, depende del tamaño de la abertura de la lente y la distancia de esta al plano de observación, debido a esto se le conoce como speckle subjetivo. Es importante señalar que las aberraciones de la lente, que normalmente se representan como errores de fase en la pupila de la lente, no tienen ningún efecto sobre las propiedades del speckle observado en el plano de la imagen y que, si bien hemos considerado solo una lente delgada simple en este análisis, se obtendrá un resultado idéntico, para cualquier sistema de imágenes siempre que la pupila de salida del sistema de formación de imágenes, se considere como la fuente correlacionada equivalente.

2.2.3.2 Tamaño del speckle en profundidad

Hasta este punto solo hemos considerado las propiedades transversales del patrón de speckle en un plano paralelo a la superficie iluminada. Ahora, nos centraremos en la dirección normal al plano de dispersión, es decir, la distancia en profundidad en la que un patrón de speckle permanece correlacionado. Dependiendo de cómo sean las coordenadas (x,y) elegidas, la correlación de profundidad puede variar, pero nos centraremos en las coordenadas $(0,0)$ ya que son resultados representativos en otros lugares, sobre todo si los ángulos son pequeños. Calcularemos la función de correlación cruzada transversal y en profundidad, pero con coordenadas $(x = 0, y = 0)$ y profundidad variable $z = z + \Delta z$:

$$J_A(\mathbf{0}, \mathbf{0}; \Delta z) = \langle A(\mathbf{0}, \mathbf{0}; z + \Delta z) A^*(\mathbf{0}, \mathbf{0}; z + \Delta z) \rangle \quad (0.61)$$

Los campos en cuestión pueden ser escritos como:

$$A(\mathbf{0}, \mathbf{0}; z) = \frac{1}{\lambda z} \iint_{-\infty}^{\infty} a(\xi, \eta) \exp[-i \frac{\pi}{\lambda z} (\xi^2 + \eta^2)] d\xi d\eta \quad (0.62)$$

$$\begin{aligned}
 A^*(\mathbf{0}, \mathbf{0}; \mathbf{z} + \Delta\mathbf{z}) &= \frac{1}{\lambda z} \iint_{-\infty}^{\infty} a^*(\xi, \eta) \exp\left[i \frac{\pi}{\lambda(z + \Delta z)} (\xi^2 + \eta^2)\right] d\xi d\eta \quad (0.63)
 \end{aligned}$$

Con $\Delta\mathbf{z} \ll \mathbf{z}$, sustituyendo esto en ec. 2.61 y considerando:

$$\frac{1}{(z + \Delta z)} \cong \frac{1}{z} \left(1 - \frac{\Delta z}{z}\right) \quad (0.64)$$

tenemos

$$J_A(\mathbf{0}, \mathbf{0}; \Delta\mathbf{z}) = \frac{k}{\lambda^2 z^2} \iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 \exp\left\{i \frac{\pi \Delta z}{\lambda z^2} (\xi^2 + \eta^2)\right\} d\xi d\eta \quad (0.65)$$

Con lo que la intensidad mutua normalizada queda dada por:

$$\mu_A = \frac{\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 \exp\left[i \frac{2\pi \Delta z}{\lambda z^2} (\xi^2 + \eta^2)\right] d\xi d\eta}{\iint_{-\infty}^{\infty} |P(\xi, \eta)|^2 d\xi d\eta} \quad (0.66)$$

Y luego la correlación de intensidades normalizada viene dada por el cuadrado de esta cantidad (15).

Ilustremos los resultados siguiendo los ejemplos anteriores, el de un punto de dispersión de intensidad uniforme de lados L y otro con forma circular.

Circular:

$$\begin{aligned}
 |\mu_A(\Delta x; \Delta y)|^2 &= \left| \frac{\int_0^{D/2} r \cdot \exp\left(i \frac{2\pi \Delta z r^2}{\lambda z^2}\right) dr}{\int_0^{D/2} r dr} \right|^2 = \text{sinc}^2\left(\frac{x}{8\pi}\right), \text{ con } x \\
 &= \frac{\pi D^2}{\lambda z^2} \Delta z \quad (0.67)
 \end{aligned}$$

Cuadrado:

$$\begin{aligned}
 |\mu_A(\Delta x; \Delta y)|^2 &= \frac{1}{L^2} \left| \iint_{-L/2}^{L/2} |P(\xi, \eta)|^2 \exp\left[i \frac{2\pi \Delta z}{\lambda z^2} (\xi^2 + \eta^2)\right] d\xi d\eta \right|^2 \\
 &= \left| \sqrt{\frac{2\pi}{x}} \left[C\left(\sqrt{\frac{x}{2\pi}}\right) + iS\left(\sqrt{\frac{x}{2\pi}}\right) \right] \right|^4, \text{ con } x = \frac{\pi L^2}{\lambda z^2} \Delta z \quad (0.68)
 \end{aligned}$$

donde $C(z)$ y $S(z)$ son las integrales de coseno y seno de Fresnel.

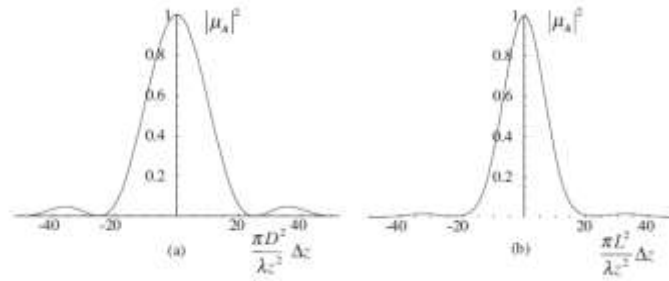


Figura 11 Grafico de la intensidad normalizada para a) punto circular y b) punto cuadrado (15).

En la Figura 11 se muestra gráficamente estos resultados. El ancho de correlación, está dado por el ancho de las curvas en su medio máximo, para cada ejemplo están dados aproximadamente por:

$$\text{Circular: } (\Delta z)_{1/2} = 6.7\lambda \left(\frac{z}{D}\right)^2 \quad (0.69)$$

$$\text{Cuadrado: } (\Delta z)_{1/2} = 4.8\lambda \left(\frac{z}{L}\right)^2 \quad (0.70)$$

Si bien nos hemos concentrado en la geometría del espacio libre, los resultados para la geometría de formación de imágenes son los mismos siempre que la pupila de salida del sistema de imágenes se considere el punto de dispersión efectivo.

Geometría de formación de imagen

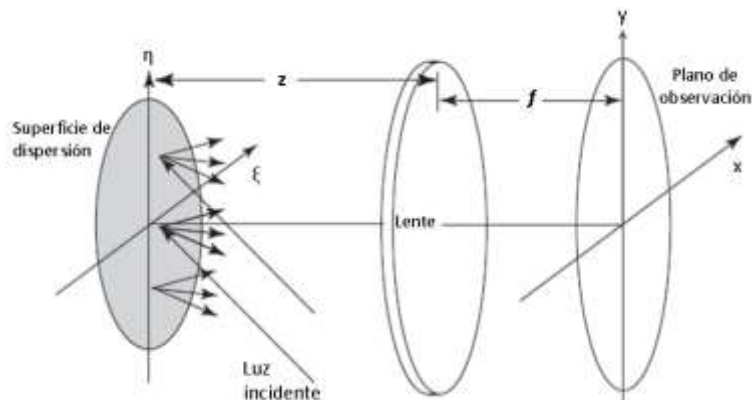


Figura 12 Región de observación en el plano focal posterior de una lente positiva (15).

Supongamos que la superficie de dispersión se encuentra frente a una lente positiva y la región de observación se encuentra en el plano focal posterior de esa lente tal como se observa en la Figura 12. En este caso, los campos en los dos planos focales están relacionados por (29):

$$A(x, y) = \frac{e^{i\frac{\pi}{\lambda f}(1-\frac{z}{f})(x^2+y^2)}}{\lambda f} \iint_{-\infty}^{\infty} a(\xi, \eta) \exp\left[-\frac{2\pi}{\lambda f}(\xi x + \eta y)\right] d\xi d\eta \quad (0.71)$$

donde, como de costumbre, $a(\xi, \eta)$ es el campo justo a la derecha de la superficie de dispersión, $A(x, y)$ es el campo en la región de observación, f es la distancia focal de la lente y z es la distancia desde la superficie de dispersión a la lente.

Ahora podemos calcular la función de correlación de los campos observados J_A en términos de la función de correlación de los campos dispersos J_α como en ecuación 2.42 pero con la excepción de que J_α de la ecuación 2.41 en vez de tomar la forma δ , toma la forma separable siguiente:

$$J_\alpha(\xi_1, \eta_1; \xi_2, \eta_2) \simeq \sqrt{I(\xi_1, \eta_1)I(\xi_2, \eta_2)}\mu_a(\Delta\xi, \Delta\eta) \simeq I(\xi_2, \eta_2)\mu_a(\Delta\xi, \Delta\eta) \quad (0.72)$$

En esta aproximación hay implícitas dos cosas, la primera es que como μ_a solo depende de ξ y η entonces las fluctuaciones del campo complejo disperso en la superficie son estacionarias (es decir, solo dependen de las diferencias de coordenadas de medición), y segundo que el ancho del punto de dispersión es mucho mayor que el ancho de correlación del campo a y de ahí que en ese ancho de correlación $I(\xi_1, \eta_1) \approx I(\xi_2, \eta_2)$. Con lo que la función de correlación de los campos observados queda de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} J_A(x_1, y_1; x_2, y_2) &= \frac{1}{\lambda^2 f^2} \exp\left[\frac{\pi}{\lambda f}\left(1 - \frac{z}{f}\right)(x_1^2 + y_1^2 - x_2^2 - y_2^2)\right] \iint I(\xi_2, \eta_2) \exp\left[-i\frac{2\pi}{\lambda f}(\Delta x \xi_2 + \Delta y \eta_2)\right] d\xi_2 d\eta_2 \\ &\times \iint \mu_a(\Delta\xi, \Delta\eta) \exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda f}(x_1 \Delta\xi + y_1 \Delta\eta)\right] d\Delta\xi d\Delta\eta \end{aligned} \quad (0.73)$$

Geometría del espacio libre.

Para la geometría del espacio libre, aparte de los detalles del factor de fase sin importancia que precede a las integrales, es el mismo resultado obtenido para la geometría de formación de imagen (15):

$$\begin{aligned} J_A(x_1, y_1; x_2, y_2) &= \frac{1}{\lambda^2 f^2} \exp\left[\frac{\pi}{\lambda z}(x_1^2 + y_1^2 - x_2^2 - y_2^2)\right] \iint I(\xi_2, \eta_2) \exp\left[-i\frac{\pi}{\lambda z}(\Delta x \xi_2 + \Delta y \eta_2)\right] d\xi_2 d\eta_2 \\ &\times \iint \mu_a(\Delta\xi, \Delta\eta) \end{aligned} \quad (0.74)$$

$$\exp \left[i \frac{2\pi}{\lambda z} (x_1 \Delta \xi + y_1 \Delta \eta) \right] d\Delta \xi d\Delta \eta$$

En ambos escenarios, la primera de estas dos integrales es una transformada de Fourier directa y, de hecho, es idéntica a la que obtuvimos cuando asumimos una amplitud de onda con correlación δ en la superficie, la segunda integral es una transformada de Fourier inversa y es un resultado directo del hecho de que la onda dispersa no es δ correlacionada. De hecho, esta segunda integral produce una amplia variación de la intensidad media en la región de observación (15).

La función de correlación de amplitud de los campos dispersos determina que tanto se extienden los ángulos en los que la luz se propaga lejos de la superficie de dispersión en cada punto, mientras que la distribución de intensidad a través del punto de dispersión determina qué tan fina será la estructura del moteado. Esto quiere decir que el tamaño medio de un speckle depende del tamaño de la distribución de intensidad en el punto de dispersión. Nos referiremos a esta relación como el teorema de Van Cittert-Zernike generalizado. Así, mediante mediciones de la información de intensidad media observada, en principio se puede deducir la forma de la correlación de campo en la superficie por medio de una transformada de Fourier inversa.

Ahora bien, nuestro interés es la relación entre las fluctuaciones de la superficie-altura con las fluctuaciones del campo disperso $a(\xi, \eta)$. En general, esta relación es extremadamente compleja ya que depende de las variaciones de la pendiente de la superficie en la reflexión, la dispersión múltiple, el sombreado y los efectos de la propagación desde la superficie real al plano (ξ, η) , justo encima de la superficie. A los fines prácticos de este análisis, comentaremos los resultados del modelo simplificado seguido por Goodman (15), en el que concluye que la función de correlación de amplitud de onda en la superficie de dispersión depende de manera compleja tanto de la función de correlación superficie-altura como de la desviación estándar superficie-altura, dicho resultado se puede observar en la Figura 13.

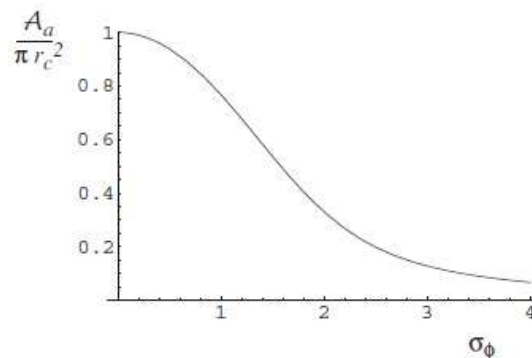


Figura 13 Área de coherencia de onda normalizada vs la desviación estándar de la fase (14).

Se muestra un gráfico del área de correlación A_a de las ondas normalizada por el área de correlación superficie-altura que está definida por πr_c^2 vs la desviación estándar σ_ϕ de las

fluctuaciones de fase. Se observa que cuando la desviación estándar de la fase alcanza el valor π , el área de correlación de onda es aproximadamente 1/10 del área de correlación superficie-altura. Para iluminación normal y dirección de observación normal, esto corresponde a una desviación estándar de la altura de la superficie de aproximadamente $\lambda/4$. La razón del encogimiento del área de correlación de ondas a medida que aumenta la desviación estándar de la fase, se debe a que cuando las fluctuaciones de fase comienzan a exceder los 2π radianes, vuelven a entrar en el intervalo $(0, 2\pi)$.

Otra propiedad del speckle que depende de la rugosidad de la superficie es el contraste, en donde los cálculos de Goodman (15) concluyen que, para una superficie perfectamente plana, el contraste del speckle desaparece y que a medida que aumentan las fluctuaciones de altura de la superficie, finalmente, el contraste se satura a la unidad, como se esperaba para el moteado completamente desarrollado.

2.2.4 Estadísticas del speckle integrado

Experimentalmente el speckle no es estudiado mediante un punto ideal como hasta ahora se ha hecho, si no que se integra en un área (finita, pero mucho más grande que un punto ideal) de un detector como, por ejemplo, una cámara CCD. Se puede presentar el caso de estar midiendo un patrón de speckle en movimiento y esto implica un tiempo de exposición durante el cual el detector hace el registro.

La intensidad medida por un detector de tamaño finito, viene dada por:

$$W = \frac{1}{\mathcal{A}_D} \iint_{-\infty}^{\infty} D(x, y) I(x, y) dx dy \quad (0.75)$$

donde $D(x, y)$, es una función de ponderación real y positiva, que representa la distribución de la fotosensibilidad del detector en el espacio, es igual a 1 en la zona sensible y cero fuera, $I(x, y)$ es la intensidad del patrón que se está detectando y:

$$\mathcal{A}_D = \iint_{-\infty}^{\infty} D(x, y) dx dy \quad (0.76)$$

Es el área del detector D , puede tomar distintas formas, todo depende de si el patrón de speckle está o no en movimiento y hacia qué dirección. Si se tiene un patrón que cambia temporalmente, cuyo tamaño de grano de speckle es mucho mayor que el tamaño del detector, la integración temporal de la intensidad viene dada por:

$$W = \frac{1}{\mathcal{A}_D} \int_0^T I(t) dt \quad (0.77)$$

Donde $I(t)$ representa la intensidad que cambia en el tiempo del patrón.

2.2.4.1 Integración espacial

La intensidad media registrada por un detector puede escribirse como:

$$\langle W \rangle = \frac{1}{\mathcal{A}_D} \iint_{-\infty}^{\infty} D(x, y) \langle I \rangle dx dy = \langle I \rangle \quad (0.78)$$

donde I , es la intensidad media del patrón de speckle incidente, que asumimos independiente de x e y , por lo tanto la media de la intensidad detectada, es la misma que la media real del patrón de speckle.

Deseamos encontrar la varianza de W , y para esto calculamos primero el segundo momento:

$$\langle W^2 \rangle = \iint_{-\infty}^{\infty} \iint_{-\infty}^{\infty} D(x_1, y_1) D(x_2, y_2) \langle I(x_1, y_1) \rangle \langle I(x_2, y_2) \rangle dx_1 dy_1 dx_2 dy_2 \quad (0.79)$$

Cuando un patrón de speckle es estacionario de sentido amplio, el promedio del producto de intensidades, depende solo de las diferencias de coordenadas, entonces la ecuación anterior se puede escribir como:

$$\langle W^2 \rangle = \iint_{-\infty}^{\infty} K_D(\Delta x, \Delta y) J_I(\Delta x, \Delta y) d\Delta x d\Delta y \quad (0.80)$$

Donde:

$$K_D(\Delta x, \Delta y) = \iint_{-\infty}^{\infty} D(x_1, y_1) D(\Delta x - x_1, \Delta y - y_1) dx_1 dy_1 \quad (0.81)$$

donde K_D es la función de autocorrelación determinista de la función $D(x, y)$, y la función J_I es la función de autocorrelación estadística de la intensidad $I(x, y)$. Ahora hacemos uso de las estadísticas gaussianas complejas circulares de los campos de un patrón de speckle completamente desarrollado, para escribir:

$$J_I(\Delta x, \Delta y) = \langle I \rangle^2 [1 + |\mu_A(\Delta x, \Delta y)|^2] \quad (0.82)$$

Con lo que (0.80) queda escrita como:

$$\begin{aligned} \langle W^2 \rangle &= \frac{\langle I \rangle^2}{\mathcal{A}_D^2} \iint_{-\infty}^{\infty} K_D(\Delta x, \Delta y) d\Delta x d\Delta y \\ &+ \frac{\langle I \rangle^2}{\mathcal{A}_D^2} \iint_{-\infty}^{\infty} K_D(\Delta x, \Delta y) |\mu_A(\Delta x, \Delta y)|^2 d\Delta x d\Delta y \end{aligned} \quad (0.83)$$

El primer término se reduce a $\langle I \rangle^2$ y tenemos entonces que la varianza de W , viene dada por:

$$\sigma_W^2 = \frac{\langle I \rangle^2}{\mathcal{A}_D^2} \iint_{-\infty}^{\infty} K_D(\Delta x, \Delta y) |\mu_A(\Delta x, \Delta y)|^2 d\Delta x d\Delta y \quad (0.84)$$

Otras cantidades de interés al momento del análisis de un patrón de speckle son el contraste y la relación señal-ruido de la intensidad W , que vienen dadas por:

$$C = \frac{\sigma_W}{\langle W \rangle} \quad (0.85)$$

$$(S/M)_{rms} = \frac{1}{C} = \frac{\langle W \rangle}{\sigma_W} \quad (0.86)$$

Si definimos:

$$M = \left| \frac{1}{\mathcal{A}_D^2} \iint_{-\infty}^{\infty} K_D(\Delta x, \Delta y) |\mu_A(\Delta x, \Delta y)|^2 d\Delta x d\Delta y \right|^{-1} \quad (0.87)$$

Entonces (0.85) y (0.86) nos quedan como:

$$C = \frac{1}{\sqrt{M}} \quad (0.88)$$

$$(S/M)_{rms} = \sqrt{M}$$

Para obtener una idea física del importante significado de M , para el cálculo de las estadísticas de la intensidad detectada, consideremos 2 casos, uno en el que un área de detección es muy grande en comparación con el tamaño promedio de un grano speckle, y el otro lo contrario, un área de detección que es pequeña en comparación con el tamaño promedio de un grano. Para el primer caso:

$$M \approx \left| \frac{K_D(\mathbf{0}, \mathbf{0})}{\mathcal{A}_D^2} \iint_{-\infty}^{\infty} |\mu_A(\Delta x, \Delta y)|^2 d\Delta x d\Delta y \right|^{-1} \quad (0.89)$$

Donde la integral tiene dimensiones de área y puede ser razonablemente llamado como el área de correlación del patrón de speckle \mathcal{A}_c , y

$$K_D(\mathbf{0}, \mathbf{0}) = \iint_{-\infty}^{\infty} D^2(x_1, y_1) dx_1 dy_1 \quad (0.90)$$

Tiene dimensiones de (área)⁻¹ y a su inverso se le llama área de medición efectiva \mathcal{A}_m :

$$\mathcal{A}_m = \frac{\mathcal{A}_D^2}{\iint_{-\infty}^{\infty} D^2(x_1, y_1) dx_1 dy_1} \quad (0.91)$$

Para un detector uniformemente sensible, D es igual a 1 dentro de la apertura del detector y cero fuera, en cuyo caso $\mathcal{A}_m = \mathcal{A}_D$. Con lo que:

$$M \approx \frac{\mathcal{A}_m}{\mathcal{A}_c} \quad (0.92)$$

Con $\mathcal{A}_m \gg \mathcal{A}_c$ para este caso. Por lo tanto, M se interpreta como el número de celdas de correlación de speckle dentro de la apertura del detector, en otras palabras, el número medio de granos de speckle que influyen en la medición. Para el caso 2, del tamaño promedio de un grano de speckle mucho más ancho que el área de medición, tenemos que $|\mu_A|^2 \approx 1$ y que:

$$M \approx \left| \frac{1}{\mathcal{A}_D^2} \iint_{-\infty}^{\infty} K_D(\Delta x, \Delta y) d\Delta x d\Delta y \right|^{-1} = 1, \mathcal{A}_m \ll \mathcal{A}_c \quad (0.93)$$

Para este caso M nunca es menor a la unidad, como M es el número promedio de puntos que influyen en la medición, no importa cuán pequeña sea la apertura de la medición, los resultados experimentales siempre están influenciados por la intensidad en al menos una celda de correlación.

2.2.4.2 Integración temporal

Al integrar un speckle, que es espacialmente constante pero que varía en el tiempo, se obtienen resultados similares, se repite el análisis anterior pero esta vez con respecto a las fluctuaciones temporales de la intensidad. Sea

$$W = \int_{-\infty}^{\infty} P_T(t) dt \quad (0.94)$$

M queda entonces expresado como:

$$M = \left| \frac{\int_{-\infty}^{\infty} P_T(\tau) d\tau}{\int_{-\infty}^{\infty} K_T(\tau) |\mu_A|^2 d\tau} \right| \quad (0.95)$$

Donde $P_T(\tau)$ es la función ponderada de integración y $K_T(\tau)$ es la función de autocorrelación de $P_T(\tau)$. Utilizando (0.88) para el contraste, y con $P_T(\tau) = \text{rect}\left(\frac{t-T}{T}\right)$ para una ventana de medición uniforme, obtenemos:

$$C = \left[\frac{2}{T} \int_0^T \left(1 - \frac{T}{\tau}\right) |\mu_A|^2 d\tau \right]^{1/2} \quad (0.96)$$

2.3 Speckle Dinámico

Cuando luz coherente, como la procedente de un láser, ilumina un objeto rugoso se produce un patrón de interferencia de naturaleza granular a la que llamamos speckle, esto también ocurre con luz dispersada por un objeto difusor. Si la superficie del objeto no permanece rígida, sino que presenta algún tipo de movimiento local, entonces la intensidad y la forma del speckle observado evoluciona en el tiempo, esto es, patrones de speckle dependientes del tiempo y los denominamos speckle dinámico. Este fenómeno es característico de las muestras biológicas y se denomina Biospeckle.

Generalmente hay 2 tipos de granos de speckle dinámico: traslacionales y *boiling* (o hirvientes). Los primeros son aquellos cuyas formas permanecen sin cambios y todos los granos de speckle se mueven en su conjunto en algún desplazamiento cuando se mueve el difusor, mientras que los segundos, al moverse el difusor no presentan ningún desplazamiento significativo de su posición, pero si se deforman, desaparecen y reaparecen. Este último es un comportamiento típico de patrones de speckle de objetos biológicos, pero también los podemos encontrar en otros procesos industriales no biológicos como en el secado de pintura y la hidroabsorción en geles.

La actividad dinámica se produce cuando el objeto iluminado cambia sus propiedades, ya sea debido al movimiento de los centros de dispersión, cambios en el camino óptico debido a variaciones del índice de refracción, cambios de configuración, entre otros. Si se mueve un objeto difuso, los granos individuales del patrón de speckle también se mueven y cambian de forma, por tanto, el patrón de speckle en movimiento contiene así información sobre el objeto en movimiento, o información sobre el fenómeno que causa dicho movimiento. Se han realizado muchos esfuerzos para asignar valores que se correlacionen favorablemente con distintos métodos de medición para el interés de cada experimentador (11). El estudio de la evolución temporal de los patrones de speckle puede proporcionar una herramienta interesante para caracterizar los parámetros involucrados en estos procesos como veremos en la siguiente subsección.

2.4 Modelos y métodos de Procesamiento

El uso de los patrones de speckle, como descriptores de una variable biológica o física, implica obtener de un objeto iluminado información útil, basándonos en una transformación de un tipo de señal a otra distinta, que permita al observador evaluar, mediante imágenes procesadas o números, las variables bajo control. Existen una amplia cantidad de modelos teóricos y numéricos, análisis estadísticos y frecuenciales, así como también de métodos de procesamiento, para el estudio de las propiedades de los patrones de speckle, que permiten extraer información de un objeto o muestra, ya que como es sabido la estructura de este patrón, depende de la textura de la superficie y las condiciones de iluminación, por tanto, cualquier cambio en estas condiciones produce

cambios relacionados en el patrón de speckle. En lo que sigue describiremos en qué consisten las diferentes técnicas de estudio de speckle y speckle dinámico, y nos detendremos en explicar a detalle aquellas más utilizadas en el campo.

2.4.1 Modelos Teóricos y Numéricos

Los modelos teóricos, permiten reproducir los complejos fenómenos relacionados con la interacción de la luz y la materia biológica y no biológica, como por ejemplo los cambios en una superficie electroerosionada, mediante un análisis de su patrón de speckle dinámico, también son utilizados para el estudio de los cambios de rugosidad en superficies dieléctricas o metálicas, en donde es muy importante utilizar una técnica no invasiva, mientras que los numéricos se han utilizado para simular el fenómeno del speckle dinámico, como una forma alternativa a los modelos teóricos, que se concentran principalmente en simulaciones no biológicas.

Algunos de estos modelos (30) (31) se basan en la propagación libre, utilizando los conceptos básicos de la formación del patrón de speckle, siendo la fase el origen principal de los cambios de patrones en el tiempo. La comparación con datos experimentales reales mostró, que los modelos reproducen varias características de los experimentos y conocimientos teóricos previos de la dinámica simplificada.

2.4.2 Análisis estadísticos

Describe enfoques numéricos, para analizar los patrones dinámicos de speckle producidos por materiales biológicos y no biológicos, bajo iluminación láser, mediante estadísticas de primer y segundo orden, para análisis de contraste o de dominio temporal del patrón. Los métodos más populares son: el método estadístico de segundo orden THSP (por sus siglas en inglés para *time history speckle pattern*) y la función de autocorrelación, que describiremos a continuación.

2.4.2.1 Método estadístico de segundo orden: THSP.

Este método fue propuesto por primera vez por Oulamara *et al* (32), y es más que todo utilizado para medir la velocidad de dispersiones en objetos (biológicos o no). Estas medidas se basan principalmente, en estimaciones de qué tan rápido ocurren los cambios de intensidad en el THSP. Los THSP representan el historial de tiempo del patrón de speckle como imágenes. Estas imágenes muestran diferentes texturas, para diferentes fenómenos o diferentes estados del mismo fenómeno.

Mediante una cámara CCD, se obtiene la secuencia de k imágenes, se digitalizan a 8 bits por un capturador de cuadros y se almacenan en la computadora. En cada imagen se selecciona una columna, normalmente la del medio, y con ese conjunto seleccionado se forma una imagen compuesta de $k \times k$ píxeles, a esta imagen se le denomina THSP, las filas representan diferentes puntos del objeto y las columnas representan su estado de intensidad en cada instante muestreado, con lo que la actividad de la muestra aparece cuando la intensidad cambia en dirección horizontal, es decir, un arreglo donde la dirección vertical es el espacio y la horizontal el tiempo.

2.4.2.2 Función de autocorrelación

Se utiliza con frecuencia, en el procesamiento de señales para analizar funciones o series de valores, como señales en el dominio del tiempo, proporciona una relación mutua entre dos o más variables aleatorias, y es útil para encontrar patrones repetidos en una señal, o identificar la frecuencia fundamental de una señal. Subsecciones atrás realizamos una descripción de las estadísticas de segundo orden a un grano del patrón de speckle, donde nos familiarizamos con la función de autocorrelación de la intensidad y de los campos. En el procesamiento de señales dada una señal $f(t)$, la autocorrelación continua $Af(\tau)$ es la correlación cruzada continua de $f(t)$ consigo misma, un tiempo τ después (11), y se define como:

$$Af(\tau) = f^*(-\tau) \otimes f(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t + \tau)f^*(t)dt = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)f^*(t - \tau)dt \quad (0.97)$$

Donde \otimes representa la convolución. Así como aplicamos las estadísticas de segundo orden, para hallar el ancho promedio de un patrón de speckle, el ancho a la mitad del máximo (*full width at half maximum* ó *FWHM*) de la autocorrelación aplicada en un THSP, se usa para medir el tiempo de vida medio de un grano.

2.4.3 Análisis Frecuenciales

Son métodos utilizados para caracterizar la evolución de las series de tiempo de los patrones de speckle dinámico, dentro del análisis de tipo frecuencia y tiempo-frecuencia, el proceso se basa en descomponer una señal, en componentes de frecuencia, es decir, señales exponenciales complejas o señales sinusoidales, y la herramienta matemática para el análisis espectral es la transformada de Fourier.

Entre los métodos tipo frecuenciales tenemos los de filtrado de espectro (33), cuando la señal de speckle se genera mediante una mezcla de diferentes dinámicas de moteado, como el biospeckle, puede ser necesario un filtrado de frecuencia apropiado o una amplificación dependiente de la frecuencia. También tenemos el espectro de densidad de potencia, que puede ser aplicado a dos THSP (34), análisis de frecuencia de tiempo (35), y descriptores basados en señales filtradas (36).

2.4.4 Descriptores de actividad.

Una manera de recolectar datos, es registrar imágenes sucesivas de patrón de speckle mediante una cámara CCD y un capturador de fotogramas, almacenar en un computador, para luego hacer un análisis digital de las mismas. En diversos experimentos, la actividad de los granos del speckle, que se muestra en la imagen de un objeto, no es uniforme sobre la superficie de la muestra, puede mostrar diferencias locales debido a variaciones en sus distintos orígenes. A esto se denomina imágenes de actividad (9).

Esta técnica es una alternativa fácil de implementar, ya que, en pocas palabras, se basa en la comparación de dos estados con diferente actividad antes y después de alguna activación, parecido a las imágenes de resonancia magnética funcional. Algunas técnicas se pueden implementar en tiempo real o casi en real, ya sea con escaneo o sin

configuraciones de escaneo, de manera no invasiva. Dado que la actividad depende de varios orígenes posibles, las imágenes de actividad también mostrarán diferentes características según los algoritmos utilizados y los métodos de registro. Las imágenes de actividad, son representaciones en las que algunas características del speckle dinámico, se representan como niveles de gris o colores (37).

Como la actividad está asociada a cambios de intensidad, en el historial de cada píxel de la imagen, entonces los descriptores que miden dichos cambios son candidatos para seleccionar las regiones de igual actividad. Describiremos a continuación el procesamiento mediante el uso de Diferencias Generalizadas, el método LASCA y el método sugerido por Fujii.

2.4.4.1 Método de Fujii (Diferencias promediadas)

Este descriptor de actividad fue propuesto por primera vez por Fujii (38), inicialmente destinado a la medición del flujo sanguíneo. Fujii utiliza un sensor lineal CCD y un láser He-Ne, expandido por una lente cilíndrica a una línea. La línea, proyectada en la muestra, se refleja en el sensor lineal. Cuando se escanea sucesivamente la intensidad de la imagen speckle, los valores registrados cambian de un escaneo al siguiente, como en cuadros consecutivos en la adquisición de imágenes CCD antes mencionada. A medida que aumenta la velocidad del flujo sanguíneo, también lo hace la variación de intensidad del patrón de speckle.

A continuación, se mide e integra la diferencia entre los datos de salida de cada píxel. Se repite durante más de un centenar de exploraciones. La variación espacial del nivel de flujo sanguíneo, o mapa de microcirculación, puede visualizarse trazando los valores integrados. El cálculo real se realiza utilizando la siguiente ecuación:

$$D(n) = \sum_{n=1}^N \frac{|I_k(n) - I_{k+1}(n)|}{I_k(n) + I_{k+1}(n)} \quad (0.98)$$

Denominada diferencia promedio. Donde I_k es la altura del pulso de la señal de salida para el n -ésimo punto de píxel del k -ésimo escaneo del sensor CCD dado por:

$$I_k(n) = \int_0^{\Delta T} I(t) dt \quad (0.99)$$

Donde ΔT es el intervalo de detección del sensor. El efecto de este algoritmo es actuar como un filtro de paso de banda en la señal entrante. El paso de banda del filtro se puede ajustar modificando el tiempo de integración ΔT . El efecto del denominador tiene por objetivo compensar los efectos de reflectividad e iluminación no uniforme. Así, la diferencia del numerador es amplificada si el denominador toma valores más pequeños.

2.4.4.2 Diferencias generalizadas.

Es un descriptor de actividad que fue propuesto por primera vez por Arizaga *et al* (39). Esta operación, ponderada por el promedio de intensidad en los fotogramas consecutivos,

es el algoritmo utilizado en el método de Fujii, pero en lugar de analizar las diferencias entre dos valores de intensidad temporalmente inmediatos, ahora se tienen en cuenta las diferencias con todos los valores de intensidad presentes en la señal. En este descriptor una imagen $I'_k(j, k)$ se construye a partir de un gran número de fotogramas consecutivos calculando el resultado dado por la ecuación:

$$I'(i, j) = \sum_k \sum_l |I_k(i, j) - I_{k+l}(i, j)| \quad (0.100)$$

donde $I_k(i, j)$ es la intensidad en el punto con coordenadas (i, j) en el k -ésimo fotograma, y las barras indican el valor absoluto. Es decir, todas las posibles diferencias entre todos los diferentes fotogramas se suman en valor absoluto para cada punto de la imagen. Significa que la comparación entre imágenes, se realiza en todas las escalas de tiempo disponibles y los resultados se promedian. Como se comparan todos los valores de $I_k(i, j)$, el resultado de la diferencia generalizada, no depende del orden de aparición de los valores. Cuanto mayor es la magnitud de este descriptor, mayores son las variaciones de la señal de speckle.

2.4.4.3 Método LASCA

LASCA son las siglas de *Laser Speckle Contrast Analysis*; análisis de contraste de speckle láser. Es un método propuesto por Briers y Webster (40), para la obtención de imágenes a tiempo real de la perfusión sanguínea, que se puede utilizar en otros fenómenos con una dinámica similar. Consiste en medir el contraste espacial en una imagen integrada en el tiempo.

LASCA utiliza las estadísticas espaciales de primer orden del moteado integrado en el tiempo, es una técnica casi en tiempo real y sin escaneo. Si las variaciones de la intensidad son relativamente rápidas, el tiempo de integración finito en el sistema de adquisición, origina que la desviación estándar $\sigma_{x,y}$ de la intensidad medida I disminuya, así como también lo hace el contraste definido por:

$$C = \frac{\sigma_{x,y}}{\langle I \rangle} \quad (0.101)$$

donde $\langle I \rangle$ es el promedio espacial de la intensidad. El contraste es una medida del desenfoque debido al tiempo finito de integración del sistema de detección que disminuye cuanto mayor actividad hay, por lo tanto, la imagen construida sobre esta base es un contraste invertido, mostrando a la inversa regiones oscuras en lugares activos.

En fenómenos ergódicos (fenómenos en los que las medidas estadísticas espaciales también son representativas de las medidas estadísticas temporales), la varianza espacial de la intensidad, puede ser relacionada con la autocovarianza temporal de la intensidad mediante:

$$\sigma_s^2 = \frac{1}{T} \int_0^T C_v(\tau) d\tau \quad (0.102)$$

Donde:

$$C_v(\tau) = \langle (I(T) - \langle I \rangle_t)(I(t + \tau) - \langle I \rangle_t) \rangle \quad (0.103)$$

Es la autocovarianza temporal de la intensidad. Asumiendo Ergodicidad (41) tenemos:

$$C_v(\tau) = \langle I \rangle^2 C_t(\tau) \quad (0.104)$$

Siendo $C_t(\tau)$ la función de autocorrelación temporal de la intensidad. Mientras más alta actividad haya, más rápido cae la autocorrelación de la intensidad, y menor es el contraste espacial en la imagen integrada en el tiempo. Esta cantidad está relacionada con el espectro de potencia ampliado de la luz dispersa, por el teorema de Wiener-Khintchine a través de una transformada de Fourier. Entonces si la autocorrelación es conocida o medida, se puede predecir el comportamiento de las imágenes LASCA y relacionarlo con el origen físico o conocimiento experimental previo.

Cuando la luz dispersa muestra un espectro Lorentziano, la autocorrelación es una exponencial negativa pura, debido del teorema de Wiener-Khintchine. El contraste puede calcularse analíticamente a través de:

$$k = \frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} = \left\{ \frac{\tau_c}{2T} \left[1 - \exp\left(-\frac{2T}{\tau_c}\right) \right] \right\}^{1/2} \quad (0.105)$$

Donde T es el tiempo de exposición de la cámara CCD y τ es el tiempo de autocorrelación.

2.4.4.4 Diferencias Temporales

Creado inicialmente para la detección de cambios en imágenes de sistemas de vigilancia visual (42) (43). Es un método reciente modificado y propuesto por Martí y otros (44) para la detección de actividad en patrones de speckle dinámico. En este método, dos imágenes de una escena separadas por un intervalo de tiempo, se restan una de la otra para detectar si la escena ha cambiado o no. Para el caso de imágenes de speckle dinámico, la diferencia de dos imágenes se puede relacionar con la actividad de los granos de speckle. Si no se puede detectar la diferencia de dos imágenes de speckle en el ruido de fondo, podemos afirmar que no hay actividad, o que es insignificante en comparación con el ruido de fondo. Si, por el contrario, la diferencia de imagen supera el ruido de fondo, podemos afirmar que hay actividad speckle. En este método, a las imágenes resultantes de la diferencia, se le pueden aplicar los métodos de procesamiento estadísticos o cualquier otro descrito anteriormente.

Tal como será mencionado posteriormente en el capítulo 3, el método de las diferencias temporales fue utilizadas para la caracterización de la cámara CCD y la detección del cambio de actividad debido a la variación de la concentración de las muestras en estudio, es por esto que nos dedicaremos a describirlo a detalle matemáticamente a continuación.

La cámara CCD adquiere la exposición radiante del patrón de speckle, como una imagen de resolución de $M \times N$ píxeles, con un período de muestreo temporal T . Además, consideramos que los píxeles, tienen forma cuadrada con una longitud lateral d . Si asumimos que la intensidad $I(r,t)$, no varía apreciablemente durante el tiempo de exposición t_e , entonces la energía radiante $E(m,n,k)$ capturada por el píxel con coordenadas $x = md$, $y = nd$, en el momento $t = kT$, correspondiente al k -ésimo fotograma, se puede escribir como:

$$E(m,n,k) = \iint_{A_{m,n}} \int_{kT}^{kT+t_e} I(\mathbf{r}, t) dx dy dt \approx I(m,n,k) t_e d^2 \quad (0.106)$$

donde $m = 1, 2, 3, \dots, M$; $n = 1, 2, 3, \dots, N$; $k = 1, 2, 3, \dots, K$; K es el número de fotogramas, y $A_{m,n}$ denota la región de m, n píxeles. La imagen capturada viene con ruido, suponiendo ruido electrónico aditivo en cada píxel, obtenemos que los elementos de la matriz de imagen $S(m,n,k)$ del patrón de moteado se pueden escribir en la forma:

$$S(m,n,k) = I(m,n,k) t_e d^2 + E_{ruido}(m,n,k) \quad (0.107)$$

donde $E_{ruido}(m,n,k)$ es la exposición de intensidad equivalente al ruido electrónico. Ahora definimos los elementos de la matriz $\|D(m,n,k)\|$ de diferencias como:

$$D(m,n,k) = [(I(m,n,k+p) - I(m,n,k))] t_e d^2 + (E_{ruido}(m,n,k+p) - E_{ruido}(m,n,k)) \quad (0.108)$$

Donde $p=1, 2, 3, \dots; p+k < K$.

Si

$$\langle (I(m,n,k+p) - I(m,n,k))^2 \rangle t_e^2 d^4 \leq \sigma_{ruido}^2 \quad (0.109)$$

Donde:

$$\sigma_{ruido}^2 = \langle [E_{ruido}(m,n,k+p) - E_{ruido}(m,n,k)]^2 \rangle \quad (0.110)$$

Entonces en esa zona no hay actividad de moteado o se ha perdido en el ruido de fondo. Si, por el contrario:

$$\langle (I(m,n,k+p) - I(m,n,k))^2 \rangle t_e^2 d^4 > \sigma_{ruido}^2 \quad (0.111)$$

La señal de actividad speckle aumenta con el ruido de fondo. Siguiendo a los autores Martí y otros (44). Si tenemos un periodo de muestreo mayor que el tiempo de correlación del campo de speckle dinámico, esto es $T \gg \tau$, tendremos entonces patrones de speckle no correlacionados y definimos:

$$\langle I(m, n, k + p) \rangle > I_{umbral} = \frac{\sqrt{2\sigma_{ruido}^2}}{2t_e d^2} \quad (0.112)$$

Si la condición (0.112) se cumple, entonces el patrón no está correlacionado y puede interpretarse, como una condición necesaria, para obtener una actividad de moteado detectable en un ruido de fondo. Siendo entonces I_{umbral} el valor umbral de la intensidad, si es mayor está correlacionado y si no, no lo está.

En la práctica, la intensidad media debe elegirse de modo que $I(m, n, k) \gg I_{umbral}$, para facilitar la segmentación de la zona de actividad de la imagen speckle, durante su procesamiento digital. Ahora bien, si el speckle está completamente correlacionado, entonces:

$$(I(m, n, k + p) - I(m, n, k))^2 = 0 \quad (0.113)$$

En consecuencia, la diferencia del patrón de speckle se pierde en el ruido de fondo y no se puede detectar ninguna actividad. Del análisis anterior podemos concluir que si el intervalo de tiempo pT es mayor que el tiempo de correlación y la intensidad media es lo suficientemente grande, las matrices de la imagen de diferencia $\| \| D(m, n, k) \| \|$ contienen zonas donde se cumple la expresión (0.111) y que esta propiedad se puede utilizar para identificar la zona de actividad, permitiendo incluso medir su área.

2.5 Aplicaciones

Actualmente existe un gran número de aplicaciones a diversos fenómenos, haciendo uso de la técnica de speckle dinámico. A medida que evolucionan las técnicas de almacenamiento y procesamiento, la técnica se hace más accesible de implementar, en nuevos fenómenos sobre todo porque permite un estudio sin contacto, no destructivo y en la mayoría de los casos no perturbativo y con un funcionamiento en tiempo real o casi real, particularidades que atraen a investigadores de distintas ramas. Como mencionamos anteriormente, se puede aplicar la técnica de speckle tanto a materiales biológicos como no biológicos, sus aplicaciones pueden ser científicas, industriales, médicas, agrónomas, entre otros. A continuación, describiremos sus aplicaciones más comunes y con mayor potencial.

2.5.1 Aplicaciones en muestras biológicas

Las muestras biológicas son muy complejas, ya que tienen una red de interacciones asociadas con una gran cantidad de elementos, por tanto, cuando se iluminan muestras con las mismas características, no se obtendrá la misma respuesta con exactitud y es esta variabilidad la que se maneja mediante el uso de réplicas y análisis estadísticos. Por lo tanto, los informes de las aplicaciones del speckle dinámico, se basan principalmente en una evaluación estricta de valores medios y otras medidas estadísticas (11).

Es de esperar entonces que los resultados presentados por el speckle dinámico o *Biospeckle*, se relacionan con muchos factores en un fenómeno colectivo, mediante una medida global, siendo esta la mejor manera de obtener un resultado consistente (45). En

esta subsección, cubriremos las aplicaciones del speckle dinámico, en distintas áreas biológicas y se dará una breve revisión de los más utilizados y actuales estudios.

2.5.1.1 Aplicaciones agrícolas

La tecnología del speckle láser, es una técnica de evaluación no destructiva que se puede utilizar de manera automatizada, agilizando los procesos de análisis de alimentos, como por ejemplo evaluar el estado de maduración de frutas y verduras. No solamente en la rama de alimentos, se hace uso del speckle, sino también en la reproducción animal agrícola, tal como veremos a continuación.

Frutas

Una de las evaluaciones en la que más se utiliza la técnica del speckle dinámico, es en el análisis de calidad de las frutas. Cuando la fruta está creciendo o envejeciendo su actividad celular sufre una modificación que se refleja en su biospeckle. Esto se debe a que el soporte mecánico de la célula vegetal, es mantenido por una pared celular, cuya función básica es proteger la membrana celular contra rupturas mecánicas y osmóticas. La pared celular, entre otros elementos, está constituida por hemicelulosas, pectina y proteínas estructurales. Después de la cosecha y durante el proceso de madurez, la mayor parte de la pectina se disuelve, lo que reduce la fuerza de atracción entre las células, es decir, durante este proceso hay actividades específicas de maduración en la fruta. La estructura celular, puede variar de un espécimen a otro y el movimiento de los componentes celulares también. Por tanto, se puede esperar que el speckle formado por diferentes células sea diferente y que, además, el speckle cambiará a medida que la célula envejezca. En otras palabras, se puede usar un speckle para distinguir especímenes y también la edad del material biológico.

El primer trabajo que mostró diferencias, en la evaluación del speckle temporal entre una manzana, un tomate y una naranja fue hecho por Oulamara et al (46). Luego el trabajo de Xu y Col (47) demostró que el biospeckle podría utilizarse para controlar la edad y la vida útil de los especímenes botánicos (naranjas, papas, manzanas, rábanos, tomates) porque las fluctuaciones temporales de los granos de speckle, disminuyen con el envejecimiento. Utilizando un láser He-Ne polarizado como fuente de luz coherente y una cámara de matriz CCD, conectada a un procesador de imágenes, demostró que el ancho total a la mitad del valor máximo (*FWHM*) de estas muestras con diferentes tiempos de cosecha, varió de 0.33 segundos con frutas de 1 día a 0.97 segundos con frutas de 2 semanas. Esta variación ocurre, porque en todo el período de observación, la actividad de la muestra disminuye con el tiempo, y luego las variaciones del speckle disminuyen, resultando en un aumento de la autocorrelación *THSP* y, en consecuencia, su *FWHM*.

Zhao et al (48) confirmó estos resultados y adicional informó que una mayor actividad de *biospeckle* indica una mayor velocidad de flujo en las venas de las muestras botánicas, por lo que este método también se puede utilizar para monitorear el transporte de nutrientes.

Existen también otros fenómenos, que causan cambios en el speckle de la fruta que permiten estudiarla a través de este, como es el estudio de lesiones, por ejemplo,

hematomas en material biológico como frutas y verduras. Pajuelo et al (49) han probado el daño en manzanas utilizando varias técnicas de speckle dinámico, utilizaron métodos cuantitativos, incluida la autocorrelación de la historia temporal de los patrones de speckle. Para visualizar la actividad de forma cualitativa y visualizar las zonas dañadas se utilizó la diferencia generalizada ponderada (WGD), el LASCA y el método de Konishi.

También se ha demostrado que la temperatura de almacenamiento afecta la fluctuación medida del biospeckle (50). Los índices calculados de la dinámica del biospeckle de la manzana (es decir, el contraste del speckle, el momento de inercia y el coeficiente de correlación) disminuyeron cuando se enfrió la muestra.

Semillas

En el estudio de la calidad de semillas, uno de los desafíos es la evaluación del vigor y la viabilidad de la semilla (51). Una pieza clave para ello es la humedad y el speckle dinámico tiene una gran capacidad de seguimiento de esta. La medición de humedad es una prueba clave en la producción y almacenamiento de semillas y granos, que requiere soluciones tecnológicas diferenciadas con altos niveles de precisión y exactitud, además de robustez y simplicidad.

Braga, R. A. et al. (52), haciendo uso del método de diferencias generalizadas, utilizó 100 imágenes de semillas de frijol bajo iluminación láser He-Ne, con un intervalo de 0,08 segundos entre cada fotograma, demostró que el patrón de actividad de speckle dinámico de semillas hidratadas, es mayor que el patrón de actividad de semillas secas. Un estudio reciente utilizando también diferencias generalizadas, pero en semillas de uchuva y adicional utilizando diferencia temporal, confirmó este resultado, con los dos métodos se detectó mayor actividad en los patrones de speckle dinámico en las semillas vivas hidratadas, que en las semillas vivas secas y no viables secas (53).

También se implementaron técnicas de speckle dinámico, para la detección de contaminación por hongos en semillas (52) (54). Braga Jr. y col. adoptaron los métodos diferencias generalizadas e intensidad media, así como el algoritmo de Fujii, para la evaluación de la fluctuación del biospeckle en la semilla de frijol. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad de la técnica empleada, para identificar la presencia de microorganismos en el frijol. Las semillas inoculadas con hongos exhibieron mayor actividad de biospeckle, en comparación con el grupo de control.

Reproducción animal

El área de reproducción bovina es de gran interés en la rama de la agronomía. Uno de los criterios más importantes en este tema, es el relacionado a la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides. El análisis físico del semen (55) consiste en la evaluación del volumen, la motilidad macroscópica e individual, la concentración, morfología de los espermatozoides y la presencia de elementos inusuales en el eyaculado, como leucocitos, células sanguíneas y células inmaduras del linaje del espermatogénesis.

En los últimos años se han desarrollado algunas técnicas y dispositivos en el campo del análisis, para la manipulación de semen y gametos, utilizando principios láser. En el

proceso de espermatogénesis, se ha demostrado que el láser puede tener efectos bioestimuladores sobre las células germinales, también se realizan ensayos de preselección del sexo de los espermatozoides, haciendo uso del láser y numerosas otras aplicaciones.

El uso de la técnica de speckle dinámica no demoró en figurar. Desde el año 2005 un grupo multidisciplinario de la Universidad Federal de Lavras, Brasil (56) (57), ha realizado múltiples esfuerzos para desarrollar la tecnología del láser biospeckle, como una herramienta confiable para analizar muestras de esperma de animales. Los primeros resultados se obtuvieron utilizando el THSP y el momento de inercia, que fueron útiles para discriminar diferentes actividades de motilidad del semen de carnero y mostrar una alta coherencia, en comparación a los análisis de microscopía óptica comunes. Además, la técnica pudo seguir los cambios que se producían en la muestra, cuando los espermatozoides iban reduciendo su actividad, provocada por un proceso de enfriamiento.

En el semen congelado de toro (*Bos taurus indicus*), se observó que el biospeckle era sensible a muestras de semen con actividad alta y baja, también para detectar patrones de disminución de la motilidad (velocidad y porcentaje de células móviles), a lo largo del tiempo, que es muy útil para evaluar la viabilidad del semen, especialmente después del descongelamiento.

Múltiples parámetros pueden ser medidos en un análisis físico del semen, entre ellos el tiempo de licuefacción. El semen es un gel espeso en el momento de la eyaculación que normalmente, se vuelve líquido minutos posteriores a la eyaculación. El tiempo de licuefacción, es el tiempo que tarda el semen en volverse líquido, y normalmente es evaluado visualmente, es decir se necesita de un perito evaluador. Dicho parámetro permite caracterizar el estado reproductivo de la especie en estudio, permitiendo hacer comparaciones, que permitan acrecentar la eficiencia de la reproducción, por ejemplo, del ganado vacuno.

En 2020 Leal (58) creó un método, con la técnica de speckle dinámico que permite medir el tiempo de licuefacción de una muestra de semen, haciendo una modificación del método de las diferencias temporales, consideró para el procesamiento 10 fotogramas y obtuvo la diferencia temporal en 500 puntos, separados en intervalos de 2 segundos. En su trabajo, definió el tiempo de licuefacción T_L como el tiempo transcurrido en alcanzar el 98% del valor de la intensidad registrada del speckle, adicional pudo obtener otro parámetro, el tiempo de contracción del pene T_C . Si bien el ensayo fue realizado con una muestra de semen humano, el autor indica que puede ser empleado para cualquier tipo de muestra de semen, y puede ser un utilizado para el diagnóstico de la fertilidad o infertilidad de un individuo, este estudio representa una base potencial para el estudio de la viabilidad del semen bovino.

Al obtener de manera cuantitativa el tiempo de licuefacción del líquido seminal, permite evaluar la actividad de la glándula prostática, reflejando la función de las glándulas

sexuales accesorias, estado directamente relacionado con la motilidad y morfología de los espermatozoides, permitiendo también comparar las características del líquido seminal entre distintas especies (58).

2.5.1.2 Monitoreo de Parásitos

Con la tecnología láser, se han desarrollado numerosos estudios de la motilidad de los parásitos. Especialmente, aquellos con afines a la evaluación de la acción de los fármacos a corto plazo sobre estos. El speckle dinámico permite evaluar la actividad de los parásitos bajo diferentes concentraciones del fármaco. Ansari M. et al (59) mostraron resultados en su trabajo sobre la correlación espacio-temporal y el tamaño del grano de speckle, para evaluar la acción inmediata de la *Epirrubicina* sobre los parásitos *Trypanosoma Cruzi*, paso necesario antes del tratamiento de infecciones, al considerar las estadísticas de segundo orden de las imágenes de speckle. Sus resultados arrojan que la *Epirrubicina* produce en el primer minuto un efecto a corto plazo, sobre la actividad del patrón de *biospeckle* de *T. cruzi*, que permanece con un perfil similar hasta los 15 min. Utilizaron el método *motion history image* (MHI), el método MHI evita la complejidad, así como el gran cálculo en los métodos basados en el emparejamiento de secuencias y detecta un cambio en el patrón de moteado.

En diferentes artículos (60) (61), autores en común al trabajo mencionado anteriormente, hacen uso de distintos métodos de speckle dinámico, LASCA, Imagen del Historial de Movimiento (HMI, siglas en inglés para *Motion History Image*), entre otros, implementando la tecnología de procesamiento de información de imagen digital, sus resultados sugieren que este tipo de análisis, puede ser una plataforma para probar la susceptibilidad de parásitos a fármacos específicos, lo cual tiene aplicaciones potenciales en microbiología, desarrollo de vacunas e identificación temprana de microorganismos. Específicamente en el análisis realizado con el MHI sobre la respuesta del *T. Cruzi* ante la *Epirrubicina*, el método no solo diferencia la actividad de los parásitos en presencia y ausencia del fármaco, sino que también es capaz de detectar un efecto instantáneo de la *Epirrubicina*, sugiriendo que la aplicación de este método, es eficaz para el estudio de la respuesta instantánea del parásito ante otros fármacos candidatos.

2.5.1.3 Aplicaciones Médicas

Fercher y Briers (62) informaron de la primera aplicación biomédica, pero esta técnica no era en tiempo real y tenía limitaciones prácticas, debido a que no usaba sistemas digitales, lo que impedía su uso clínico. Con el desarrollo de adquisición y procesamiento digital, en la década de los 90, fue que se presentaron los desarrollos esenciales de la aplicabilidad clínica del speckle dinámico.

En medicina, la técnica del speckle dinámico es comúnmente llamado Imagen de Speckle Láser o Imagen de Contraste de Speckle Láser (LSCI, por sus siglas en inglés). LSCI se utiliza principalmente, para mapear los sistemas de flujo, especialmente el flujo sanguíneo. Como ya sabemos existe una conexión entre las fluctuaciones del patrón de speckle y el movimiento de los centros de dispersión en los organismos vivos, por ejemplo, el movimiento de los glóbulos rojos y una forma en la que se manifiestan las fluctuaciones

del speckle es en una reducción del contraste normalmente alto del patrón de speckle. LSCI es una técnica basada en el cambio dinámico en esta luz retrodispersada como resultado de la interacción con los glóbulos rojos. Se puede utilizar para visualizar la perfusión en varios tejidos y, aunque esta técnica ha sido ampliamente descrita en la literatura, la implementación clínica real está rezagada (63).

Sin embargo, el LSCI representa una poderosa herramienta, para obtener imágenes de la perfusión tisular y numerosos estudios se han desarrollado con este fin. Comenzando como una herramienta de investigación analógica lenta, los sistemas LSCI ahora pueden obtener imágenes del flujo sanguíneo en tiempo real (o casi), como resultado del rápido aumento de la potencia digital. Esto permite la traducción de LSCI en la práctica clínica, donde es muy adecuado para la evaluación de la perfusión, en una amplia gama de tejidos. Entre las aplicaciones médicas tenemos:

En reumatología, se utiliza para determinar el estado de la esclerosis sistémica (64), caracterización de las etapas de la artritis en animales (65), Imágenes de speckle láser endoscópico del flujo sanguíneo tisular aplicados en la rodilla humana (66).

En dermatología, para el monitoreo de las manchas de vino de Oporto (67), potencial técnica para la evaluación de las úlceras del pie diabético, relacionadas con la isquemia local (68), mediciones de flujo de la microcirculación en las úlceras venosas (69), predicción de úlceras venosas (70) y úlceras digitales en pacientes con esclerosis sistémica (71).

La oftalmología es el campo de investigación más grande, la técnica de speckle dinámico se utiliza muy ampliamente, se usa para medir el flujo retiniano superficial y profundo (72), mediciones de perfusión de la circulación coroidea, que pueden ser críticas para el diagnóstico de diversas enfermedades como glaucoma, retinopatía y degeneración macular (73), medir la retina, la cabeza del nervio óptico (ONH) y la dinámica del flujo sanguíneo coroideo (74), detectar efectos sobre el sistema cardiovascular de enfermedades, mediante el estudio del flujo sanguíneo ocular (75).

En neurología, para el monitoreo del flujo sanguíneo cerebral (76) (77). En cirugía del tracto intestinal se usa para medir perfusión sanguínea del hígado (78), identificar áreas isquémicas en el tubo gástrico (79). En odontología, para el estudio del flujo de sangre gingival (80) y la clasificación de la caries dental (81).

2.5.2 Aplicaciones en muestras no biológicas

Las pruebas sin contacto, no destructivas y, en su mayoría, no perturbativas con funcionamiento en tiempo real, o casi, son características codiciadas del enfoque óptico que ofrece el speckle láser dinámico, para algunos problemas tanto en la ciencia como de instrumentación industrial. A continuación, describiremos las aplicaciones con más estudios en el campo a saber, el secado de pintura y la corrosión. Posteriormente una mención de otras aplicaciones en muestras no biológicas.

2.5.2.1 Secado de pintura

Uno de las aplicaciones ampliamente estudiada, es el secado de pintura. La pintura es básicamente un líquido que después de su aplicación, sobre un sustrato en una capa fina, se convierte en una película sólida opaca (11). El contenido de la pintura puede variar, y según los elementos con los que esté formado, por nombrar algunos, los disolventes, el pigmento, la resina, acrílicos, poliésteres o aceites, entre otros, y según la cantidad de los mismos, es que la pintura se utiliza. Muchos procesos industriales, involucran el recubrimiento de superficies con capas delgadas de pintura, para impartirle propiedades deseables como brillo, propiedades adhesivas, aceptabilidad de la tinta, sensibilidad a la luz y propiedades magnéticas, como barreras para prevenir la corrosión, modificar la reflexión de la luz o la radiación térmica de una superficie, entre otros.

El secado es la parte inicial del proceso de recubrimiento y este se rige, aparte de los factores ambientales, por el nivel de dilución, el tamaño de la capa de pintura y la geometría de la superficie, así como por su tipo. Las técnicas de speckle dinámico han demostrado ser herramientas útiles, para la caracterización de los procesos en el secado de pintura. Amalvy et al (82) descubrieron que es posible, utilizando el método del momento de inercia, seguir el secado de los recubrimientos tanto a base de disolvente, como a base de agua, para obtener también información sobre el proceso. Los resultados se correlacionan favorablemente, con la pérdida de peso obtenida con las mediciones gravimétricas convencionales, cuando los resultados se normalizan convenientemente.

Actualmente existen productos comerciales para evaluar el proceso de secado de pintura y tinta en tiempo real. Utilizan cámaras CCD para adquirir imágenes de patrón de speckle de propagación libre, tanto para geometrías de transmisión como de retrodispersión, como por ejemplo HORUS®, que utiliza una medición de actividad basada en una magnitud definida en unidades de frecuencia, es decir, la transformada rápida de Fourier y la densidad del espectro de potencia.

Muchas veces, cuando se quiere probar la fiabilidad de un nuevo método de speckle dinámico, se realiza primero en secado de pintura y los resultados se comparan con los encontrados en técnicas usadas anteriormente, o con los resultados de un estudio diferente como con los análisis gravimétricos. Esto debido a que, en este estudio en específico, no hay una gran cantidad de variables, como lo hay en muestras biológicas. Por lo tanto, puede usarse fácilmente como un caso de estudio.

2.5.2.2 Corrosión

La corrosión es el deterioro que sufre un material a consecuencia de un ataque químico por su entorno. Un ejemplo de ello es el debilitamiento del hierro debido a la oxidación de los átomos de hierro. La medición típica de la corrosión es una amplia gama de técnicas. El método más común utilizado para un metal o aleación, es la medición de la pérdida de peso, determinada experimentalmente por contacto directo con un medio corrosivo. Sin embargo, estudios sugerían que se podía utilizar el fenómeno de speckle también como un método de análisis. Los cambios en un perfil metálico, producen modificaciones en el patrón de interferencia bajo una iluminación de luz coherente, y el patrón de speckle

cambia con el tiempo. Por tanto, los fenómenos de corrosión también pueden estudiarse mediante la técnica del biospeckle.

El primer estudio que sugiere que las técnicas de speckle láser podrían implementarse en el campo de la corrosión metálica fue hecho por Habib K. (83). El estudio se basa en un modelo matemático, que describe la disolución catódica y la deposición anódica en metal, pudo establecer una relación entre los datos de corrosión y el cambio de rugosidad de la superficie del acero inoxidable. Más adelante surgieron estudios con cobre y latón, y se utilizó la técnica de correlación de speckle en cobre con placas inhibitoras de corrosión con sus superficies pulidas, para estudiar la oxidación en tiempo real (84).

A partir de entonces, el monitoreo de la corrosión mediante la técnica de speckle dinámica, no se ha detenido y números estudios se han realizado a lo largo de los años. La mayoría de estos estudios, se hacen con la finalidad conocer la resistencia esperada de un determinado metal o aleación, a un proceso de corrosión en un entorno específico, ya sea para fines industriales o de ingeniería, es muy importante conocer la durabilidad de un material en algunos entornos, para su uso posterior.

2.5.3 Otras aplicaciones

Otras aplicaciones del speckle dinámico que podemos encontrar son: Mediciones de tensiones y deformaciones en distintos materiales (85), medición de tensión residual (86), análisis de fractura y torsión de metales (87), detección de fugas en contenedores, análisis de comportamiento termomecánico de componentes electrónicos (88), monitorear el movimiento de partículas en un líquido (89), medir la velocidad de objetos difusos (90) y medir distancias (91), las podemos incluir como muestra del potencial del uso de esta técnica.

2.6 Antecedentes

En la Universidad de Los Andes, los estudios utilizando la técnica de speckle dinámico han sido con fines médicos y farmacéuticos. Específicamente desarrollados en su mayoría en la Sección de Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y en colaboración con el Centro Multidisciplinario de Ciencias, laboratorio de óptica del IVIC (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas), sede Mérida, en donde se desarrolló esta tesis.

El primer ensayo fue realizado por Andrades (92) en 2011, para detectar la presencia de parásitos y determinar la acción de fármacos en pozos de placas de VDRL, mediante el análisis de la evolución temporal del patrón de speckle, a una muestra de cultivo que irradian con luz láser. García (93) estandarizó el uso del speckle dinámico, para detectar la presencia de parásitos, utilizando el diseño el mismo algorítmico que Andrades. García demostró que la técnica de speckle es más rápida que los métodos *in vitro*, y que con su uso evita la contaminación del medio. En ese mismo año Lobo (94) realizó un estudio, utilizando la técnica de Biospeckle, sobre la reacción inmediata del *T. Cruzi* ante antidepresivos tricíclicos y Belandria (95) un estudio sobre el efecto de la concentración de antibiótico sobre una cepa de *Escherichia Coli*.

En estos trabajos se hizo uso del método de las Diferencias Temporales, se hace la resta de las matrices de intensidad de fotogramas consecutivos, y luego calcula la intensidad media de cada matriz de diferencia y la media de las medias de diferencia, obteniendo un solo valor de intensidad media final. Este método tiene la característica de “normalizar” y disminuir las diferencias. Los trabajos demostraron que la técnica de Biospeckle, es más eficiente que otras técnicas más comunes, para la determinación del crecimiento del microorganismo, en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, como lo son la Macrodilución y Difusión en caldo o agar.

Díaz y Gallego (96) utilizaron el método de comparación de base variable y encontraron una posible correlación entre la pendiente de la tendencia lineal, la concentración bacteriana y la concentración del antibiótico. Arrieche (97) aplicó el método de Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable, para obtener el valor de la intensidad media y pudo diferenciar el medio solo, la presencia de parásitos y el efecto de dos drogas.

Todos estos trabajos desarrollados en el la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, se procesaron a través del uso del método de diferencias generalizadas, desarrollando un programa en R comander, programa en línea www.bigjockey.com/biospeckle/, también se realiza mediante el análisis fotograma a fotograma utilizando el programa ImageJ. Para estos métodos de análisis desarrollado, hay que realizar diferentes reprocesamientos, y en alguno de los casos se realiza de manera manual. Aprovechando la versatilidad que posee el programa Matlab®, en el Laboratorio de Óptica Aplicada del IVIC, se ha desarrollado métodos automatizados para el análisis de imágenes de speckle dinámico.

Conocidas las ventajas y desventajas de los métodos desarrollados, se plantea utilizar nuevas herramientas para el análisis de speckle dinámico, por lo que es de gran interés el desarrollo de nuevas técnicas de análisis, como es el caso de la segmentación.

CAPÍTULO 3

Metodología

3.1 Equipos

3.1.1 Elementos ópticos del arreglo experimental

Fuente de luz coherente: La fuente de luz coherente utilizada fue un láser. La emisión estimulada la luz láser posee las características de ser: altamente coherente, monocromática y con un alto grado de colimación. El láser utilizado para este estudio es un DPSSL (*Diode-pumped solid-state laser*) o Láser de estado sólido bombeado, marca CNI Laser, modelo MGL-F-532, de longitud de onda $(532 \pm 1)nm$ y una potencia de salida variable desde 1,5 W hasta 2,5 W (ver Figura 14).



Figura 14 Laser DPSS (98).

- **Microscopio óptico:** Podemos describirlo como un aparato que posibilita una mejor visibilidad de objetos de menor tamaño, obteniendo una imagen aumentada de los mismos. Habitualmente los microscopios vienen equipados con 3 o 4 objetivos, cada uno con un aumento distinto y que se puede seleccionar gracias al revólver (ver Figura 15). El objetivo es el elemento más importante y complejo del microscopio óptico, ya que en él se produce la mayor parte del aumento aportado por el microscopio. Se utilizó un microscopio Nikon modelo SBR-kt, con objetivos de 4, 10, 40 y 100 X de amplificación, aperturas numéricas de 0,10; 0,25; 0,65 y 1,25. Con distancias focales de: 28,3; 14,8; 4,3 y 1,25 mm, respectivamente.



Figura 15 Microscopio Nikon SBR-kt (99).

- **Mesa Óptica:** Se utilizó una mesa óptica Nexus, marca ThorLabs, modelo T1020C. Con medidas $1m \times 0.80m \times 0.10m$, con aislamiento de vibraciones y estabilidad térmica. La mesa tiene orificios de montajes de roscado, facilitando la sujeción de los elementos que conforman el montaje experimental.
- **Beam splitter (Divisor de haz):** Un divisor de haz es un dispositivo óptico que divide un haz de luz en dos partes. Para este experimento se utilizaron 2 divisores de haz.
- **Espejo plano:** Es un elemento óptico en el cual, después de incidir, la luz se refleja siguiendo las leyes de la reflexión. En este estudio es utilizado un espejo plano para el redireccionamiento del haz luminoso, tal como se describirá más adelante en el montaje experimental.

3.1.2 Elementos electrónicos del arreglo experimental

- **Cámara CCD:** Se encarga de la conversión de una señal luminosa, en una señal eléctrica directamente digitalizada, proporcionando detectores en los dominios visible, infrarrojo y UV cercano. El funcionamiento de un detector CCD se puede resumir así: Cada píxel de la matriz CCD corresponde a un elemento semiconductor dentro de un condensador eléctrico, un fotón incidente crea un fotoelectrón cuando da a un electrón del semiconductor la energía necesaria para pasar el umbral energético (gap), los fotoelectrones son guardados en el pozo de potencial (que no es más que un píxel correctamente polarizado), la lectura de estos fotoelectrones es controlada por la polarización de los píxeles, determinada por transistores de efecto campo. Esta lectura ocurre, o bien directamente mientras un obturador tapa el objeto (la fuente de luz), o bien por transferencia de trama. En este caso, una mitad de la superficie del CCD se dedica a recibir la señal, mientras que la otra solamente ve los fotones durante su tránsito hacia el registro de lectura (100). La cámara utilizada en este estudio (ver Figura 16), fue una cámara marca ThorLabs modelo DCU223C, monocromática, de 1024×768 píxeles de resolución, con un sensor de 1/3 pulgadas marca Sony CX204AK, un área sensible exacta de $4,762 \times 3,571 \text{ mm}$, un tamaño de píxel $4,65 \mu\text{m}$, cuadrado y con la capacidad de que las imágenes de digitalizan en la cámara misma sin necesidad de un capturador de fotogramas adicional.



Figura 16 Cámara CCD ThorLabs (101) .

- **Computadora:** Para el procesamiento digital de las imágenes capturadas, se utilizó un computador con Windows 7 de 64 bit, con un procesador Intel(R) Core(TM) i-3-4150, CPU@ 3.50GHz y 8 GB de memoria RAM.

3.2 Muestra

La muestra utilizada para la creación del patrón de speckle dinámico, fue de granos de Kéfir disueltos en agua destilada, la muestra fue suministrada por Eduardo Chalbaud. Los granos de Kéfir son una masa microbiota que combina bacterias probióticas, levaduras, lípidos y proteínas, envueltos en una matriz polisacárida, denominada kefiran (102), tienen un color blanco y son de aspecto similar al de la coliflor, pero son más blandos y gelatinosos (Figura 17). Los principales microorganismos que conforman este consorcio microbiano, presente en el kéfir son la bacteria *Lactobacillus acidophilus* y la levadura (hongo unicelular) *Kluyveromyces marxianus*, aunque esto puede variar según las regiones y métodos de cultivo.



Figura 17 Granos de Kéfir (103).

La Tabla 1 muestra la amplia composición de la microbiota, presente en los granos de kéfir en porcentaje (104) y sus tamaños promedios. Debido a que los granos de kéfir están formados por una variedad amplia de microbiota con diferentes tamaños y formas, y que puede ser disuelto en concentraciones cada vez más pequeñas, es que se ha utilizado como muestra para la creación de los patrones de speckle, ya que estas características se ajustan adecuadamente a la finalidad que planteamos en este estudio, de aumentar la sensibilidad del procesamiento de las bajas intensidades, producidas por la baja actividad, en el análisis de los patrones de speckle dinámico.

Tabla 1 Concentraciones y tamaños medios de bacterias y levaduras en los granos de kéfir.

Bacterias	%	Tamaño medio
<i>Lactobacillus paracasei</i>	23,8	2,0 a 4,0 μm X 0,8 a 1,0 μm
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	16,61	0,6 a 0,9 μm X 1,0 a 1,4 μm
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	11,76	0,7 a 1,1 μm x 2,0 a 4,0 μm
<i>Lactobacillus kefir</i>	10,03	
<i>Lactococcus lactis</i>	10,03	
<i>Lactobacillus casei</i>	8,6	

Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei	7,96	
Leuconostoc citreum	5,54	
Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans	3,11	2,0 a 4,0 μm X 0,8 a 1,0 μm
Lactobacillus buchneri	2,42	0,7 a 1,1 μm x 2,0 a 4,0 μm
Levaduras	%	Tamaño medio
Saccharomyces cerevisiae	54,26	5 a 10 μm de diámetro
Kluyveromyces lactis	20,15	
Lachancea meyersii	10,85	2,7 a 5,4 μm x 3,4 a 6,0 μm
Kazachstania aerobia	14,73	

La muestra inicial utilizada en el experimento para la creación del patrón de speckle dinámico fue de 15 gr de Kéfir disueltos en agua destilada, haciendo un volumen total de 198 ml, la cual se puede apreciar en la Figura 18



Figura 18 Muestra de 198 ml de kéfir y agua destilada.

3.3 Software utilizado

3.3.1 Aplicación ThorCam

ThorCam es una aplicación de adquisición de imágenes de gran alcance, que está diseñada para uso con las cámaras ThorLabs en sistemas de 32 y 64 bits de Windows® 7 o 10. La interfaz gráfica de usuario se comunica con la cámara para proporcionar control del sistema, adquisición de imágenes y revisión de imágenes (105). Permite la grabación de capturas de imágenes en un archivo *Motion* JPEG, AVI o TIFF multipáginas para su posterior almacenamiento en la computadora anfitrión.

La interfaz (ver Figura 19) también permite ver a tiempo real, lo que la cámara está grabando. Algunas configuraciones, como el tiempo de exposición, se pueden ajustar mientras ThorCam captura imágenes. Otros, como el *binning*, solo se pueden ajustar cuando se detiene la adquisición de imágenes.

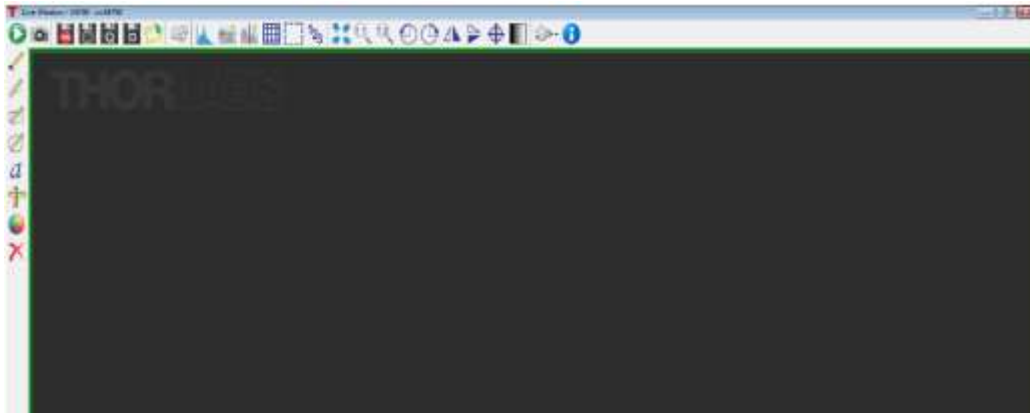


Figura 19 Interfaz de ThorCam (105)

3.3.2 Matlab®

Matlab® es la abreviatura para *MATrix LABoratory*; laboratorio de matrices; es un lenguaje de programación de alto nivel. MATLAB ofrece un entorno de desarrollo integrado (IDE) que facilita el cálculo numérico, visualización y programación en un lenguaje de programación propio (lenguaje M). Utiliza una notación matemática simple para tratar los problemas y resolverlos. Su dominio se basa en el manejo de matrices en forma eficiente, también incluye su propio compilador, lo cual permite extender su uso permitiendo al usuario crear sus propios comandos, clases y funciones.

Es un software matemático para cálculo científico (aritmético y simbólico), basado en matrices y entre sus prestaciones básicas se encuentran realizar cálculos aritméticos, simbólicos y exactos, representación de datos y funciones, realizar gráficos en 2D y 3D, la implementación de algoritmos, la creación de interfaces de usuario o GUI (siglas para *Graphical user interfaces*) y la comunicación con programas en otros lenguajes y con otros dispositivos hardware.

Las capacidades del Matlab® se pueden ampliar con las llamadas cajas de herramientas o *toolboxes* que son un conjunto de funciones (almacenadas en m-files) que proveen algoritmos para solucionar diferentes tipos de problemas. Entre las numerosas *toolboxes* presentes en el software disponemos de la *toolbox* para el procesamiento digital de imágenes, esta le proporciona a Matlab® un conjunto completo de algoritmos y herramientas gráficas tanto para el procesamiento, análisis y visualización de imágenes, así como también para el desarrollo de aplicaciones y de nuevos algoritmos, en el campo del procesamiento y análisis de imágenes digitales. Entre las funciones principales de la *Image Processing Toolbox* (IPT) destacan:

- Mejora y filtrado de imágenes y enfoque de imágenes borrosas.
- Análisis de imágenes que incluye la segmentación, morfología, extracción de funciones y medición.
- Transformaciones geométricas y métodos de registro de imágenes basados en intensidad.

- Transformaciones de imágenes.
- Herramientas interactivas, incluyendo selecciones de regiones de interés, histogramas y mediciones de distancia.

3.4 Montaje experimental

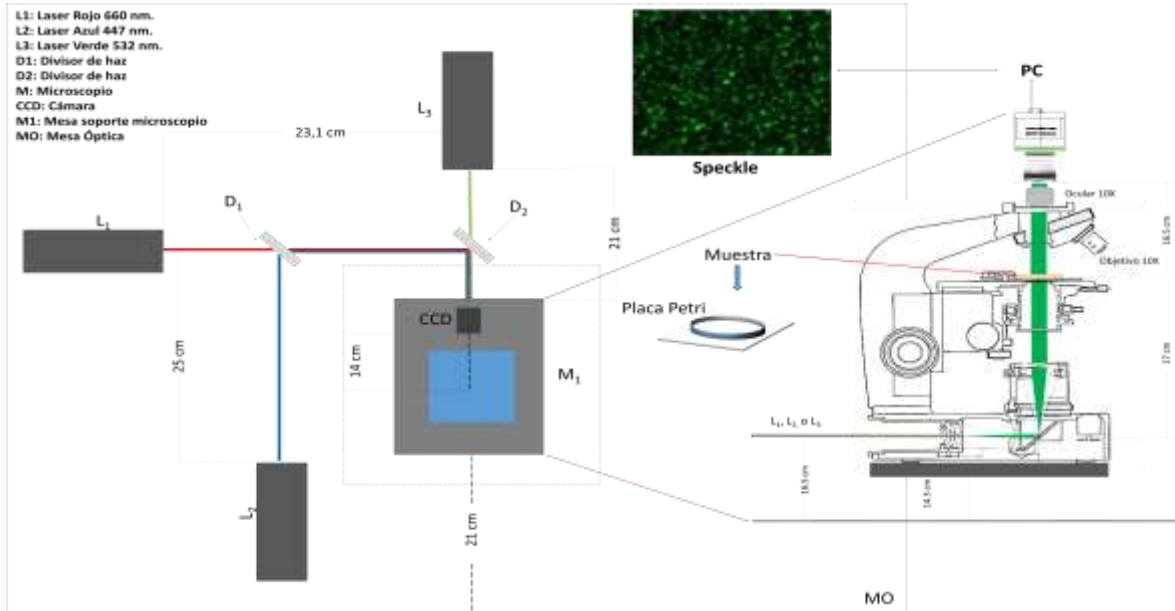


Figura 20 Montaje experimental.

El montaje experimental se muestra en la Figura 20. Este consiste en tres haces colineales, cada uno proveniente de una fuente de luz láser, sus longitudes de onda son respectivamente 447, 532 y 660 nm, correspondientes a los colores azul, verde y rojo, coincidiendo con los tres canales (sigla en inglés de *red, green, blue*) de las imágenes a color, se utilizaron dos separadores de haz (*Beam splitter*) de tal manera que los tres haces llegaran colineales a la fuente de luz del microscopio para iluminar la muestra. El haz de luz se expande, dentro del sistema óptico del microscopio, posteriormente pasa por un difusor, que genera el patrón de interferencia inicial. Con ayuda de un espejo se desvió un ángulo de 90° la trayectoria de los haces, para que atravesasen la muestra en cuestión, la cual está contenida en una placa plástica de petri de dimensiones 60x15 mm. Se emplea un objetivo con un aumento de 10 X y un ocular de 10 X, para un total de 100 X de aumento, siendo entonces un patrón de speckle dinámico subjetivo por transmisión. Los cambios en el patrón de speckle son grabados con una cámara CCD, situada en el ocular a una distancia de la muestra de 16,5 cm y acoplada a un ordenador, para el almacenamiento de las imágenes provenientes de la cámara CCD y finalmente el procesamiento de las mismas.

Este montaje diseñado en el Laboratorio de Óptica Aplicada del IVIC, tiene la peculiaridad de permitir el uso de varias longitudes de ondas, una a la vez o simultánea, permitiendo una gran versatilidad en los métodos de análisis a ser empleados.

3.4.1 Caracterización de la Cámara CCD

Se realizó la validación y optimización del montaje experimental, con el propósito de seleccionar los parámetros de la adquisición de datos, en función de la respuesta de la cámara CCD. Fue de importancia definir los parámetros de tiempo de exposición de la cámara, la potencia máxima del láser permitida por el sensor sin que se sature, la calidad de las imágenes más acorde a la capacidad de almacenamiento del PC y la cantidad de fotogramas por segundo, para la adquisición de videos en tiempo real. Estos parámetros se pueden controlar a través de la interfaz del software de ThorCam, en la sección de *Camera Settings*. Para estas pruebas se empleó una muestra de 15 ml agua destilada en la placa de petri.

Fotogramas por segundo: Una medida importante para una cámara CCD digital, es el número de fotogramas por segundo (FPS; *frames per seconds*) que es capaz de dar, es decir el número de imágenes por segundo, con el que la cámara es capaz de refrescar la imagen en el monitor del ordenador. Los cuadros por segundo de una cámara dependen de una gran cantidad de variables, tanto de la cámara digital como del propio ordenador. Pero las dos variables más importantes de las que depende el número de fotogramas por segundo son el tiempo de exposición y la velocidad de lectura del CCD o *Pixel Clock*.

Para entender cuál es la importancia de escoger la mejor cantidad de fotogramas por segundos, hay tener en cuenta que la cámara CCD al iniciar el proceso de adquisición de datos presenta lo denominado tiempo muerto o tiempo de retraso, es decir, un tiempo durante el cual el sensor no está tomando ningún dato, esto es debido a que fotograma a fotograma la cámara en la conversión de analógico a digital se ocupa y se puede perder, en este caso, el registro de pequeños cambios del patrón, esta pérdida de información puede ir desde μs a ms , depende de la velocidad de lectura y el número de fotogramas seleccionado, por tanto se hace una corrección de los mismos, en la interfaz de ThorCam se puede seleccionar el *Pixel Clock* y la misma nos indica la cantidad de fotogramas que se pierden. En la interfaz de ThorCam (ver Figura 21), sección *Camera Settings*, se llevó el *Pixel Clock* al mínimo y se fijó el FPS al máximo, se inició la captura de imágenes y luego se fue aumentando el *Pixel Clock* hasta que el software mostró un valor distinto de cero, para el porcentaje de fotogramas que se pierden, y se volvió a disminuir el valor muy por debajo del límite de caída de fotogramas. Teniendo en cuenta que el *pixel clock* y el FPS son interdependientes, al variar el *pixel clock* iba variando el FPS, y por tanto queda seleccionado el máximo FPS posible. Al existir un desfase entre el tiempo de adquisición de los videos y la duración del mismo, se fija una tasa de 5 FPS para garantizar las mediciones en tiempo real.

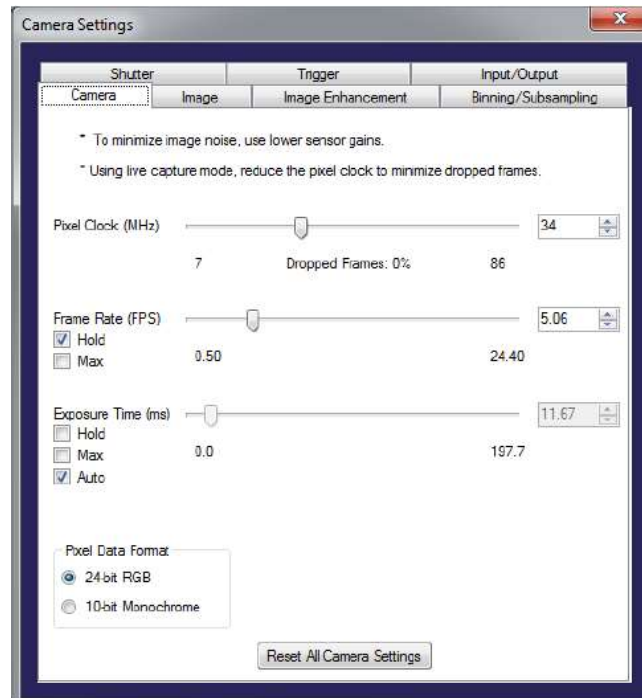


Figura 21 Interfaz ThorCam, Camera Settings (105).

Tiempo de exposición: Al considerar la selección del tiempo de exposición, el rango es también interdependiente del *pixel clock* y del FPS, para fijar un valor de ese rango se realizó una secuencia de videos variando el tiempo de exposición de los mismos y se estimó la variación de la intensidad, calculada por el método de las diferencias temporales, en función del tiempo de exposición. Como esto si depende de la intensidad de luz incidente, se hicieron 12 registros de videos de 59 s de duración para cada longitud de onda, usando el pixel clock y el FPS encontrados anteriormente, se varió para cada video el tiempo de exposición desde 10 ms hasta 130 ms en pasos de 10 ms, y a cada video por separado se le aplicó el método de diferencia temporales (44) descrito en el capítulo 2, a las imágenes resultantes de la diferencia se les calculo la intensidad media por separado, y luego se calculó la media de esas medidas con la finalidad de graficar la intensidad en función del tiempo de exposición, y escoger el valor hasta donde la intensidad siguiera un comportamiento lineal.

Como se puede observar en la Figura 22, la mejor respuesta tiempo intensidad es la dada por el láser verde, para tiempos de exposición superiores a 100 ms, no se aprecian cambios significativos en la intensidad (plató), por lo que el parámetro a ser utilizado será de 120 ms de tiempo de exposición para la adquisición de los videos de la muestra de estudio.

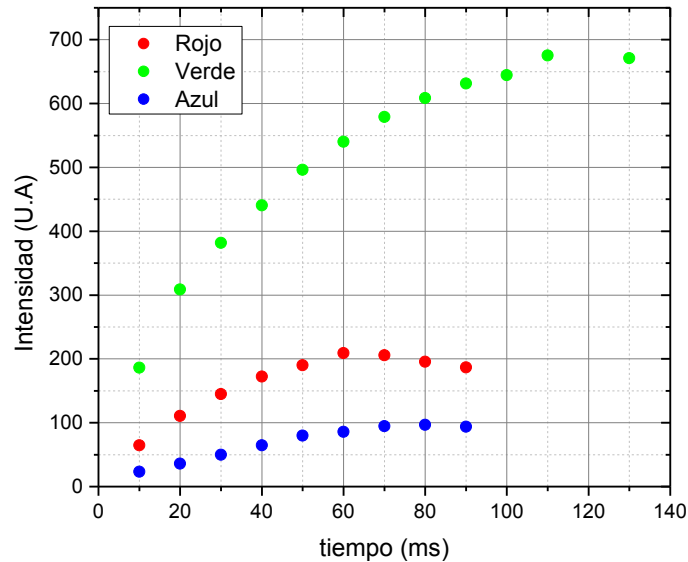


Figura 22 Respuesta cámara CCD en función del tiempo de exposición para cada uno de los láseres.

Sensibilidad: El sensor de la cámara CCD tiene una respuesta espectral, en función de la longitud de onda de luz incidente (ver Figura 23). Para el experimento se debía obtener la respuesta del sensor a cada uno de los láseres y encontrar la potencia de salida adecuada para cada uno, de tal forma que no saturaran el sensor CCD. Para esto se encendía cada láser y se obtenían a tiempo real las exposiciones de los patrones en el monitor del PC, sin necesidad de grabar, se les obtenía el Perfil de línea horizontal y vertical (*Horizontal or vertical Line Profile*), opción ofrecida por ThorCam, que dibuja una línea horizontal a lo largo de la imagen y muestra los valores de intensidad de los píxeles a lo largo de la línea para cada canal RGB. Se variaba la potencia de salida de los láseres hasta encontrar la mejor respuesta, es decir donde la imagen no presentara saturación (ver Figura 24).

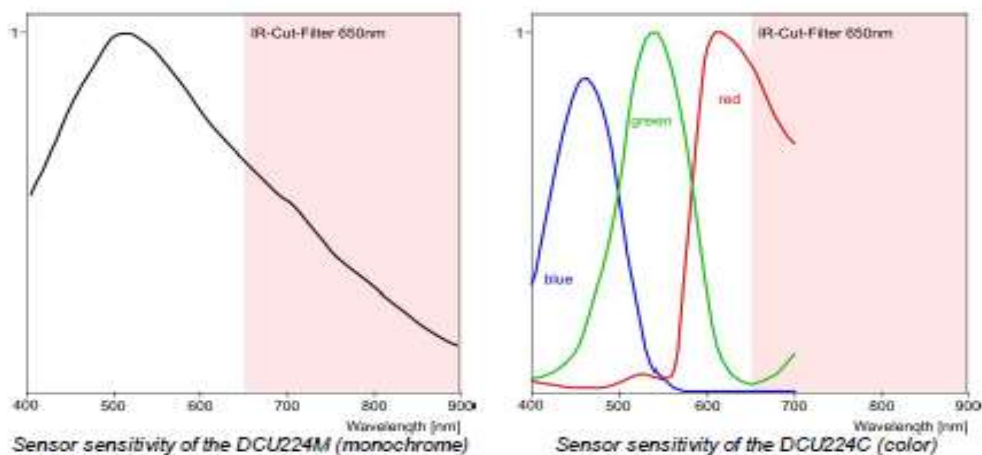


Figura 23 Sensibilidad relativa (106).

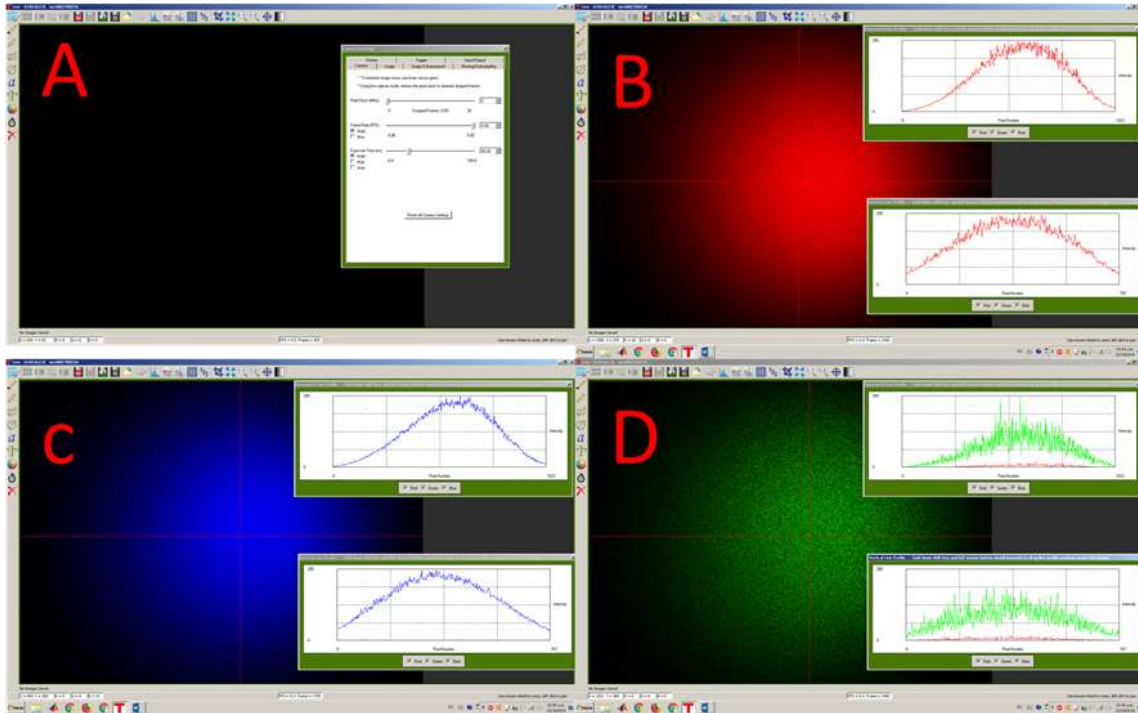


Figura 24 Ajuste de potencia de los láseres. A) Parámetros de adquisición de la cámara, B) Perfiles laser rojo, C) Perfiles láser azul, D) Perfiles laser verde.

Se mantiene constante los parámetros de adquisición de la cámara, para hacer la comparación de la respuesta del sensor en función de la longitud de onda, realizando la comparación entre la respuesta intensidad obtenidas (ver Figura 25). Encontrando una diferencia apreciable en la respuesta, siendo el de mayor intensidad el láser verde, coincidiendo con la respuesta en función del tiempo de exposición mostrada en la Figura 22

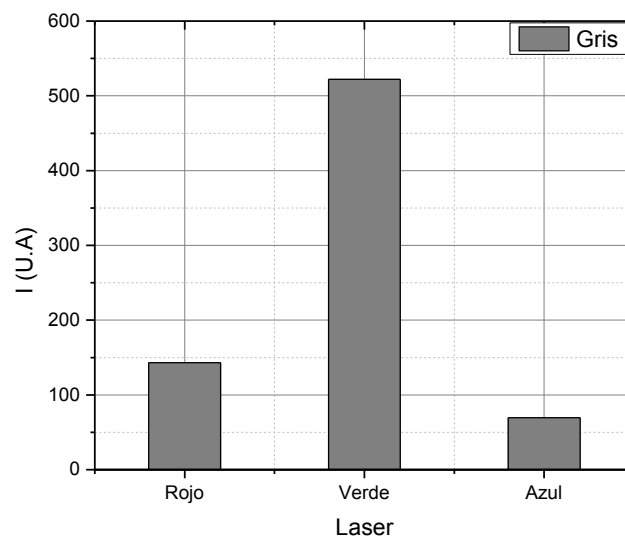


Figura 25 Respuesta cámara obtenida, para el valor de la intensidad media por el método de las diferencias temporales, para la imagen en escala de gris.

La respuesta del sistema de detección se obtiene una mejor respuesta para el láser verde, con una longitud de onda de 532 nm, por lo que se decide utilizar para nuestro ensayo solamente esta longitud de onda, ya que esta variable se espera que no sea representativa en el desarrollo de la metodología de procesamiento desarrollada en este trabajo.

Calidad de la imagen: Al iniciar la grabación la captura video, el cuadro de diálogo llamado *Record Movie* (grabación) ofrece la opción de limitar el tamaño de grabación estableciendo el tamaño máximo de archivo en Megabyte (para formatos AVI y TIFF). También se puede hacer esta limitación manipulando la calidad de la imagen entre el 10% y el 100%, con pasos de 10 % respectivamente. Estas opciones son interdependientes una de las otras. Dependiendo de la cantidad de videos y la capacidad de almacenamiento del PC para escoger el tamaño del archivo final. Como se puede observar en la Figura 26 El tamaño del archivo aumenta considerablemente para calidades superiores al 50 %, en el rango de 10% a 50% las variaciones no son muy notables, por lo que se decide escoger como parámetro de calidad para la adquisición de los videos el valor del 40 %.

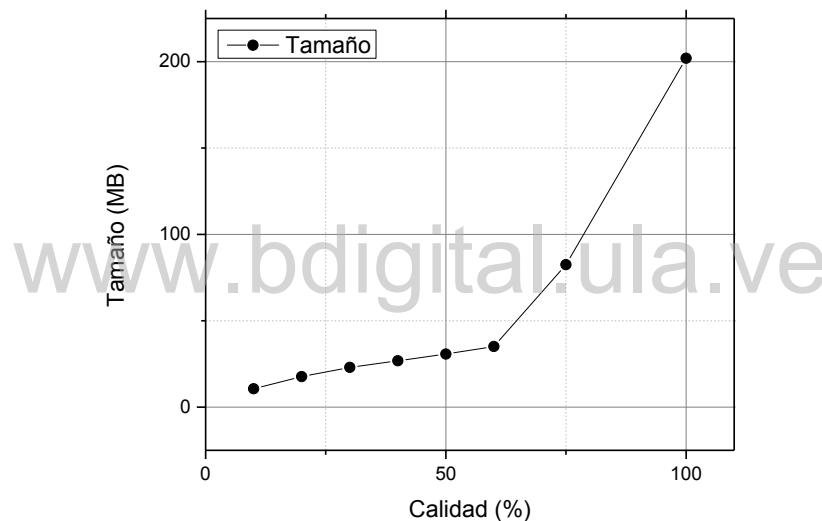


Figura 26 Tamaño del archivo de salida en función de la calidad.

Una vez realizada la validación del montaje experimental y seleccionados los parámetros más óptimos, se procede al desarrollo del experimento propuesto.

3.5 Adquisición de los datos

Se colocó la muestra sobre la platina del microscopio, se dejó reposar para evitar perturbaciones y se iluminó con el láser. Los patrones de interferencia fueron capturados por la cámara CCD, con una velocidad de obturación de 5 FPS y un tiempo de exposición de 120 ms, creando una colección de 200 imágenes. Luego con ayuda de la aplicación ThorCam fueron grabados como video en un archivo de formato .avi con 40 s de duración en total, almacenados en el PC anfitrión para ser finalmente procesados haciendo uso del software Matlab® mediante el algoritmo de segmentación aquí propuesto.

Este procedimiento se realizó 3 veces para cada una de las 16 muestras de kékir disuelto en agua destilada manteniendo siempre una solución de volumen constante de 15 ml, iniciando con una concentración del 100%, es decir, 15 ml eran totalmente de muestra inicial, y luego disminuyendo en pasos de 5% la concentración de volumen a volumen V/V% hasta llegar a 30 % V/V, con una muestra de control de solo agua destilada. Las medidas y concentraciones relativas podemos observarlas en la Tabla 5, todas con un error menor al 5%. Para cada concentración, se realizaron 3 tomas de videos con los mismos parámetros y característica descritas anteriormente, obteniendo un total de 48 videos cada uno de 200 fotogramas almacenados en la PC en formato avi.

3.6 Procesado digital de los datos

3.6.1 Segmentación

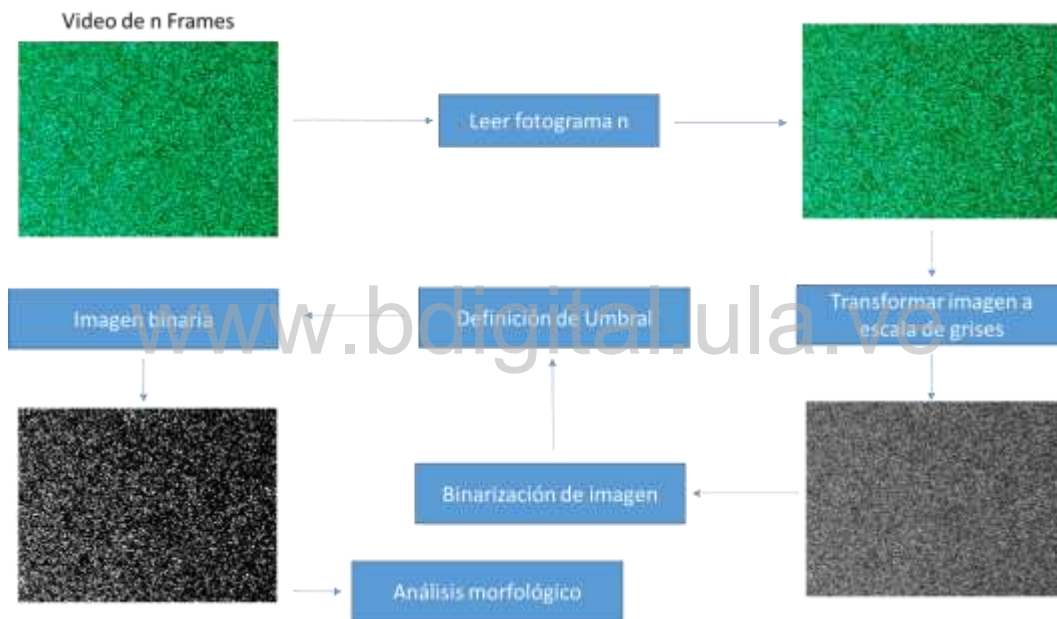


Figura 27 Procesamiento de análisis digital de las imágenes con el método de segmentación.

La segmentación, es un proceso que consiste en la división de la imagen en múltiples partes, con la finalidad de identificar objetos dentro de la imagen. También llamada umbralización, es una técnica para el procesamiento de imágenes en la que una imagen de entrada en escala de grises, se recuantifica a dos niveles de gris, es decir se convierte en una imagen binaria (107).

El fundamento de la segmentación es la determinación de un valor umbral que sirve como referencia para llevar la imagen de 8 bits, con un rango dinámico de 0 a 256 niveles de grises a binaria (2 valores), si un pixel está por debajo del valor umbral, se le asigna un valor igual 0 (el pixel pertenece al fondo de la imagen) y si está por encima se le asigna el valor de 1 (el pixel forma parte de un objeto en la imagen). Este proceso en general consiste en la lectura de los datos iniciales (video formato avi), siendo cargado fotograma

a fotograma, estas imágenes están adquiridas en composición de colores en términos de intensidad, por lo que es necesario transformarla a escala de grises, la transformación de las imágenes de RGB a escala de grises se utiliza la función de *rgb2gray* proporcionada por el *Image Processing Toolbox* (IPT) de Matlab®, realizando el cálculo de un promedio ponderado, en función del valor de cada canal (RGB) se realiza se utilizan los coeficientes utilizados para el cálculo de la luminancia ($E'y$) según El Sector de Radiocomunicaciones de la Unión Internacional de Telecomunicaciones (UIT-R) UIT-R BT.601-7, calculado con (0.114). Posteriormente es necesario la determinación del umbral, para la transformación de la imagen a binaria (Figura 27).

$$E'y = 0.299 * R + 0.587 * G + 0.114 * B \quad (0.114)$$

En la Figura 28 podemos observar el proceso de segmentación, en la cual una imagen a color RGB, es llevada a escala de grises y finalmente binarizada, con la finalidad de determinar los parámetros geométricos de las regiones de interés o motas para nuestro caso.

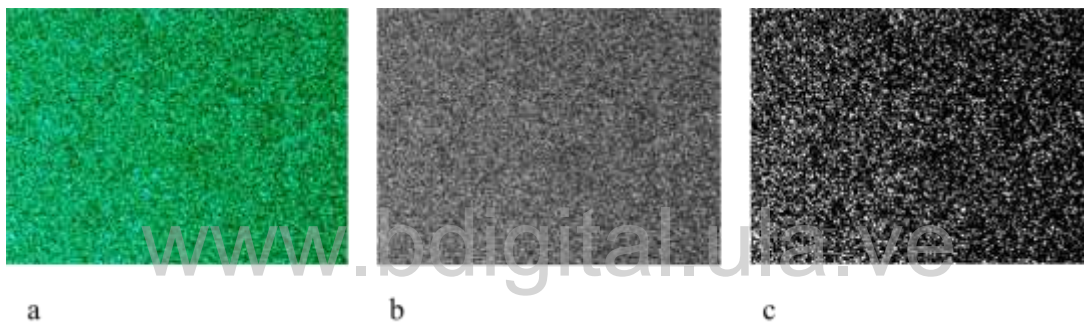


Figura 28 Proceso de segmentación a) Imagen a color RGB. b) Imagen en escala de grises. c) Imagen segmentada (binaria).

El problema de la umbralización, es la determinación del valor del umbral, que segmente la imagen, por lo que inicialmente se recurre al cálculo del umbral óptimo de manera automática, mediante el método Otsu (108), a través del comando en Matlab® *graythresh*, este método proporciona un umbral óptimo, bajo el criterio de máxima varianza entre el fondo y objeto, tomando un umbral que representa la máxima varianza entre las clases. Pero al momento de aplicarlo a los patrones de speckle, la estadística no es buena, ya que hay objetos con áreas que no son consistentes con los resultados esperados (ver Figura 29), debido a que tiene dificultades para segmentar áreas, donde hay superposición de las motas y por tanto identifica menos granos de speckle, afectando la estimación del valor medio del grano, propuesto en el presente trabajo.

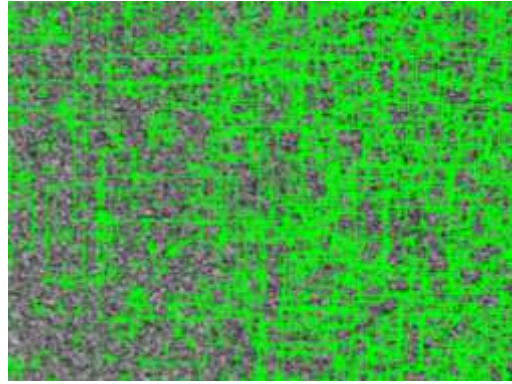


Figura 29 Objetos identificados en un fotograma, mediante umbral por método de Otsu.

Debido a esto, es necesario desarrollar un método que mejore la segmentación de las regiones, y el parámetro que hay que mejorar es la selección del umbral de binarización. Este trabajo plantea un ajuste grueso y un ajuste fino del umbral durante el procesamiento a través de una función que llamamos `umbralCal.m`, esta hace el llamado a la función `umb.m`, realizando un ajuste grueso, donde se somete cada fotograma a una variación del valor de umbral entre 0,1 y 0,9 en pasos de 0,01 y se escoge el valor umbral en donde mayor cantidad de objetos (granos de speckle) son detectados (ver Figura 30.).

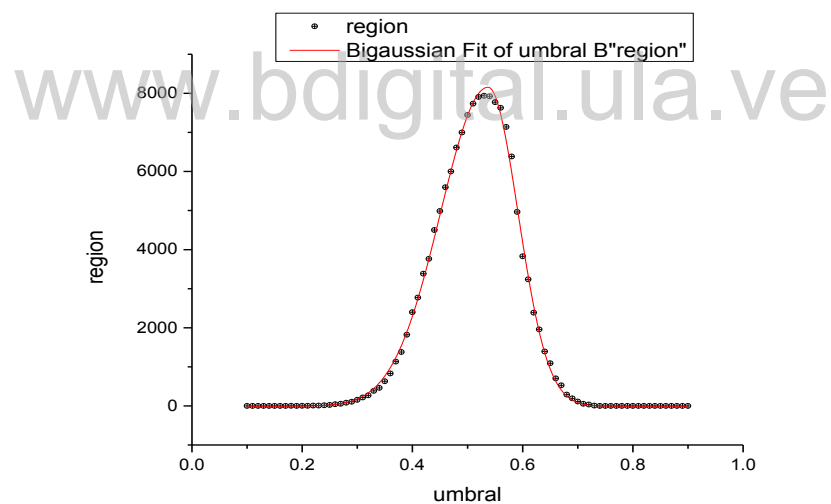


Figura 30. Ajuste grueso del umbral.

Luego se procede a lo que denominamos como ajuste fino a través de la función `umbF.m`, el cual se realiza en el rango que va entre el 5% por debajo y el 5% por encima del valor umbral encontrado en el ajuste grueso, se hace este ajuste de tal forma que se realice en 100 pasos dentro del rango de umbral, para quedarnos finalmente con el que mayor cantidad de objetos detecte (ver Figura 31), siendo este el valor utilizado para el proceso de segmentación. Este procedimiento permite hacer una distinción mejor de las motas presentes en el patrón de speckle (ver Figura 32).

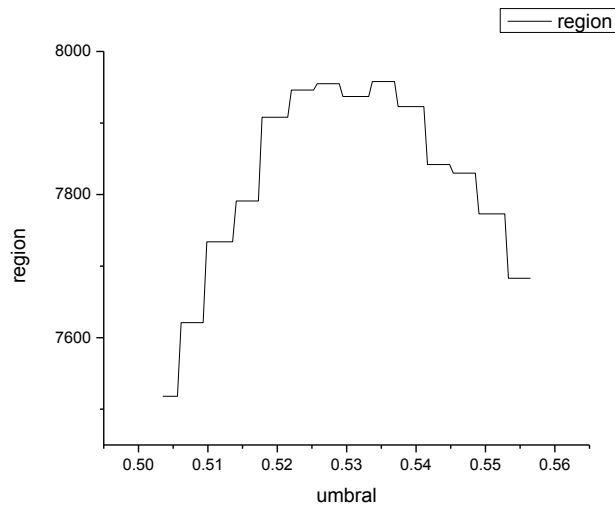


Figura 31 Ajusto fino del umbral.



Figura 32 Objetos identificados en un fotograma mediante el cálculo propuesto.

Para tener una idea más detallada del significado del umbral, es necesario realizar una gráfica de la superficie de una sección de un fotograma, en la Figura 33 se muestra la comparación entre la misma región sin el umbral (datos originales) y el perfil con el umbral, destacando la disminución del ruido de la señal, permitiendo apreciar mejor los picos de alta intensidad, que son de interés en el desarrollo de este trabajo.

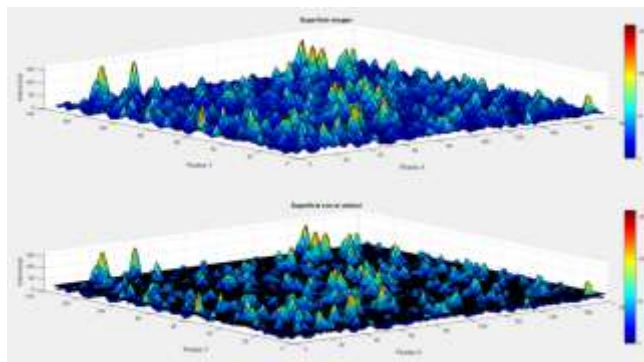


Figura 33 Superficie de un fragmento de un fotograma, donde se muestra la diferencia entre las imágenes de sin umbral y filtrada por el umbral.

3.6.2 Creación de videos a partir de filtrado por segmentación

Se cuenta con 48 videos en escala de grises, por cada uno de ellos se crean 2, uno con la información de la imagen original para los valores que superan el umbral establecido, y el otro con los valores de la imagen original para valores por debajo del umbral. Estos serán llamados como video de alta intensidad (por encima del umbral) y baja intensidad (por debajo del umbral). Clasificándolos en 3 grupos de 48 videos respectivamente: videos originales, de alta intensidad y videos de baja intensidad. Obteniéndose un total de 144 videos a ser analizados.

El programa desarrollado en Matlab®, lleva por nombre DifTs.m, para la creación de los videos a los cuales se le aplica el proceso del filtrado, este programa inicia con el llamado a la función calculo.m, en donde se carga el video. Las imágenes inicialmente son leídas en composición de colores, en términos de intensidad RGB, por lo que se requiere transformar a escala de grises, para realizar el procesado (creación de la imagen binaria), donde se hace un llamado a la función creaV.m, en esta función se carga el fotograma del video, se transforma a escalas de grises y luego se realiza el cálculo del umbral, mediante a la función umbralCal.m.

Esta función es la de mayor importancia, ya que en ella se realiza los ajustes grueso y fino del valor umbral, que fueron descritos anteriormente. Al multiplicar la imagen binaria generada por el proceso de segmentación, por el fotograma en escalas de grises de la imagen original, recuperamos todos los valores originales de cada pixel, exceptuando los valores que se encuentra por debajo del umbral calculado, siendo estos los valores de alta intensidad. El nuevo video es creado fotograma a fotograma, hasta completar el número total de fotogramas, empleando la función creaV.m, repitiendo el proceso hasta finalizar el listado inicial de la carpeta contentiva de todos los videos a ser procesados (ver Figura 36.).

Ahora bien, creaV.m nos permite obtener información de las altas intensidades, pero ¿qué hay sobre las variaciones de bajas intensidades que se pierden por el ruido de fondo y por tanto no superan los ajustes grueso y fino de umbral?, esto representa una pérdida de información al momento de obtener resultados más conformes con la realidad, para esto se plantea también una segunda función de segmentación. El proceso es el mismo descrito anteriormente, solo que en vez de hacer el llamado a la función creaV.m, se utiliza la función creaV2.m. Invirtiendo los valores de la imagen binaria generada para cada uno de los fotograma del video original, es decir, a aquellos valores de pixel que resultaron en 1 los lleva a 0 y viceversa, para luego seguir con el proceso de multiplicar esta imagen binarizada, por su original en escalas de grises y la creación el video final, recuperando así solo la información de las bajas intensidades, a las cuales se les hace el procesamiento correspondiente al estudio en cuestión (ver Figura 36.).

Finalizado el procesamiento descrito en la Figura 36., se muestra la comparación para un mismo fotograma de un video arbitrario, las diferencias entre la imagen original en RGB, transformada a escala de grises, realizado el filtrado por segmentación para altas

intensidades y finalmente el filtrado por segmentación para baja intensidades (ver Figura 34).

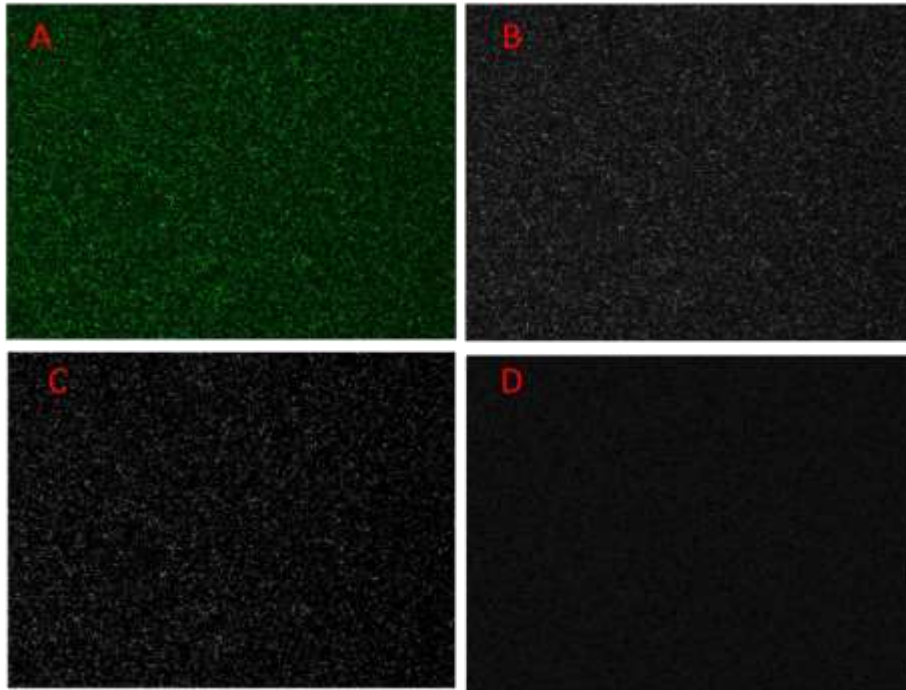


Figura 34 Fotograma de un video. A) Fotograma original en RGB, B) Fotograma original en escala de grises, C) Fotograma filtrado por segmentación alta intensidad, D) Fotograma filtrado por segmentación baja intensidad.

La diferencia entre las imágenes mostradas en la Figura 34, puedes ser apreciadas mejor, a través de el grafico de la superficie de la imagen (Figura 35),

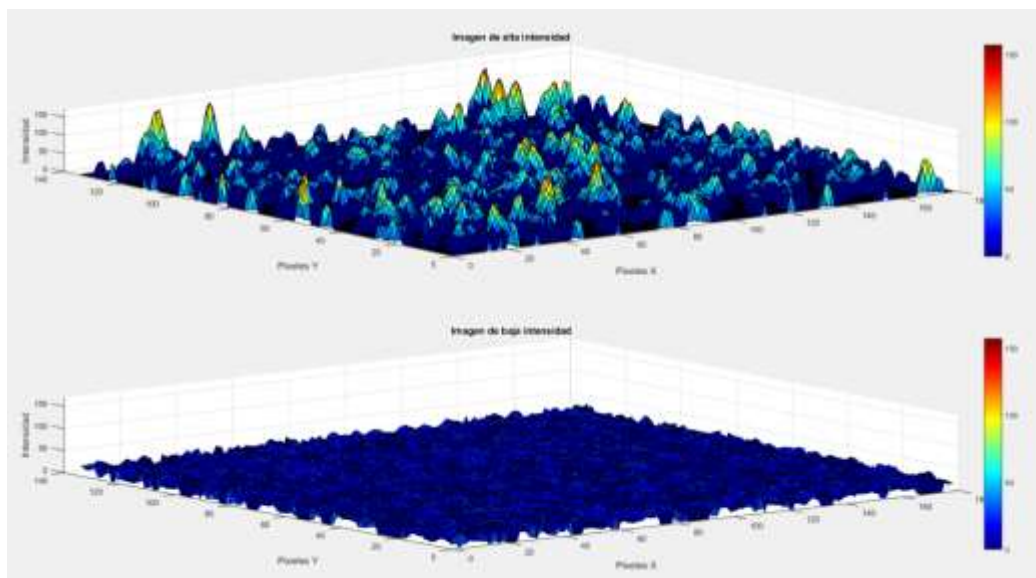


Figura 35 Superficie de un fragmento de un fotograma, donde se muestra la diferencia entre las imágenes de alta y baja intensidad.

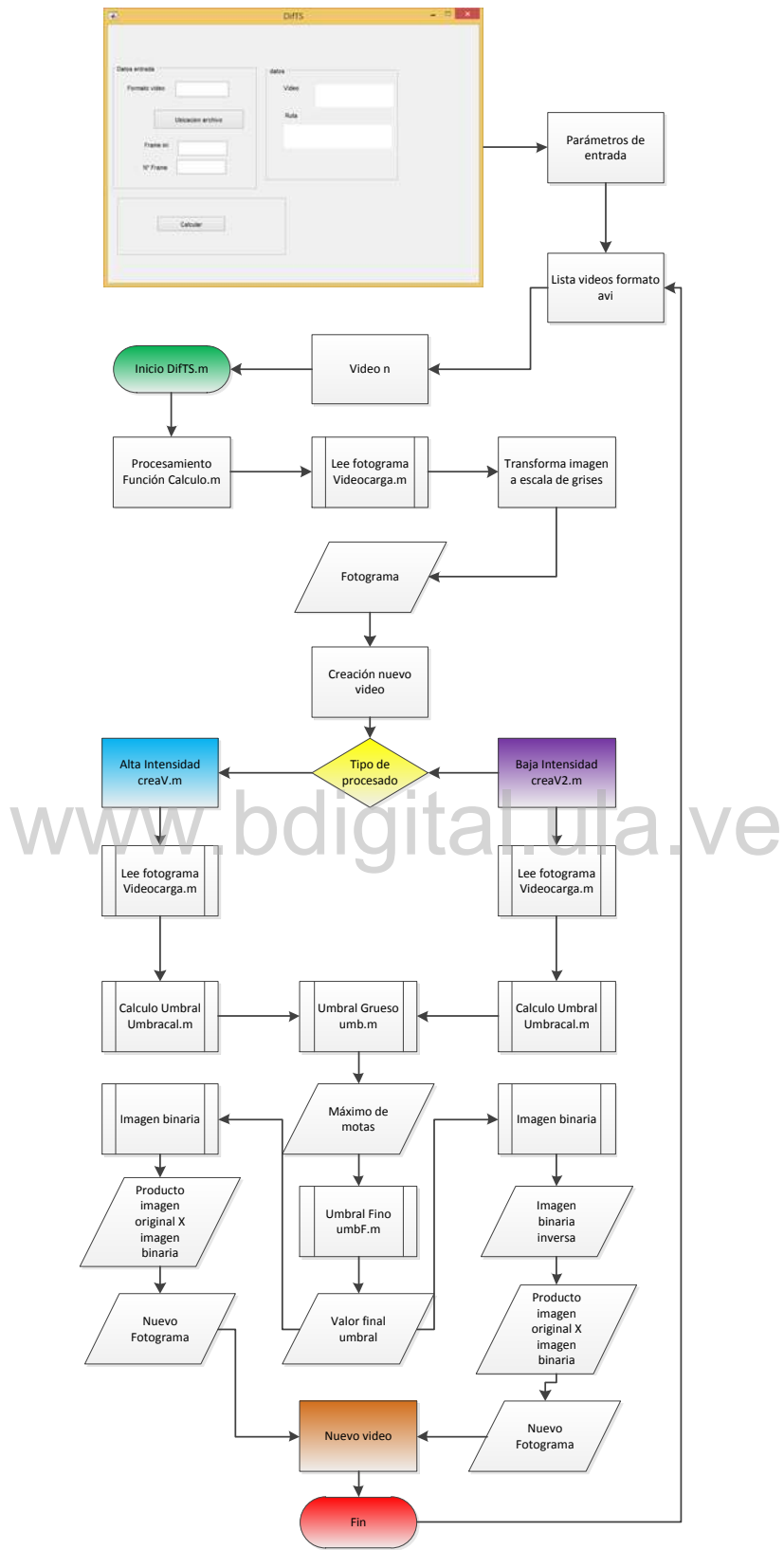


Figura 36. Flujograma la creación de los videos de alta y baja intensidad, mediante el filtrado por segmentación.

3.6.3 Análisis de las intensidades por diferencias temporales

Se cuenta con 48 videos en RGB, que transformamos en escala de grises. Siendo estos considerados como los videos originales, se procedió a realizar el análisis de intensidad por el método de las diferencias temporales (44). Definiendo a N como el número de fotogramas totales del video, donde se evaluarán la diferencia de la intensidad ($N=200$ fotogramas), aplicando diferencias temporales obtenemos las diferencias de la intensidad entre el fotograma $N=1$ y el $N=2$, siendo trasladado al $N=2$ y $N=3$, hasta llegar al fotograma $N-1=199$, finalmente se realiza la suma de todas las diferencias, obteniéndose una imagen única, que refleja la variación total temporal del patrón de interferencia (ver Figura 37). Para cada muestra se adquieren 3 videos por cada variación de la concentración, los cuales se promedian para un único valor promediado por concentración, esto con la finalidad de calcular gráficamente la variación de la intensidad en función de la concentración, esto es variaciones porcentaje volumen-volumen ($V/V\%$).

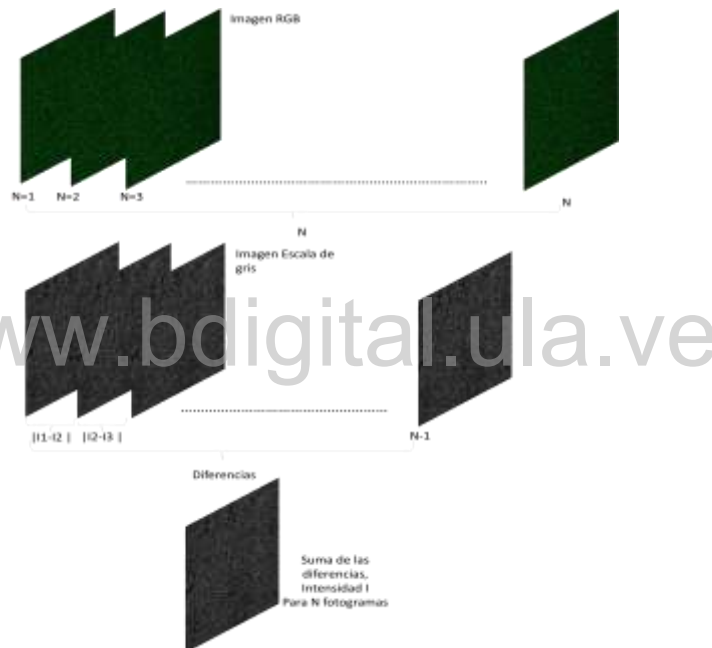


Figura 37 Método de las diferencias temporales.

Para realizar estos cálculos se desarrolla un programa en Matlab®, que realiza de manera automatizada el procesamiento de los videos, mediante el código Diftem3.m, a través de la generación de un listado (todos los videos en formato avi), generando los valores del pixel medio y desviación estándar para cada uno de ellos, sin tomar en cuenta los pixeles iguales a cero 0. Este no hace llamado a funciones. Los parámetros de entrada son el formato de video. El fotograma inicial y número de diferencias de imágenes a ser calculada, para nuestro caso frame ini es 1 y N° frame 200, no es necesario ingresar el tiempo ya que no estamos haciendo un análisis temporal, todos los programas están diseñados para realizar otras actividades del laboratorio, por lo que son códigos que pueden realizar diferentes actividades. Los pasos para dicho cálculo se describe en la Figura 38.

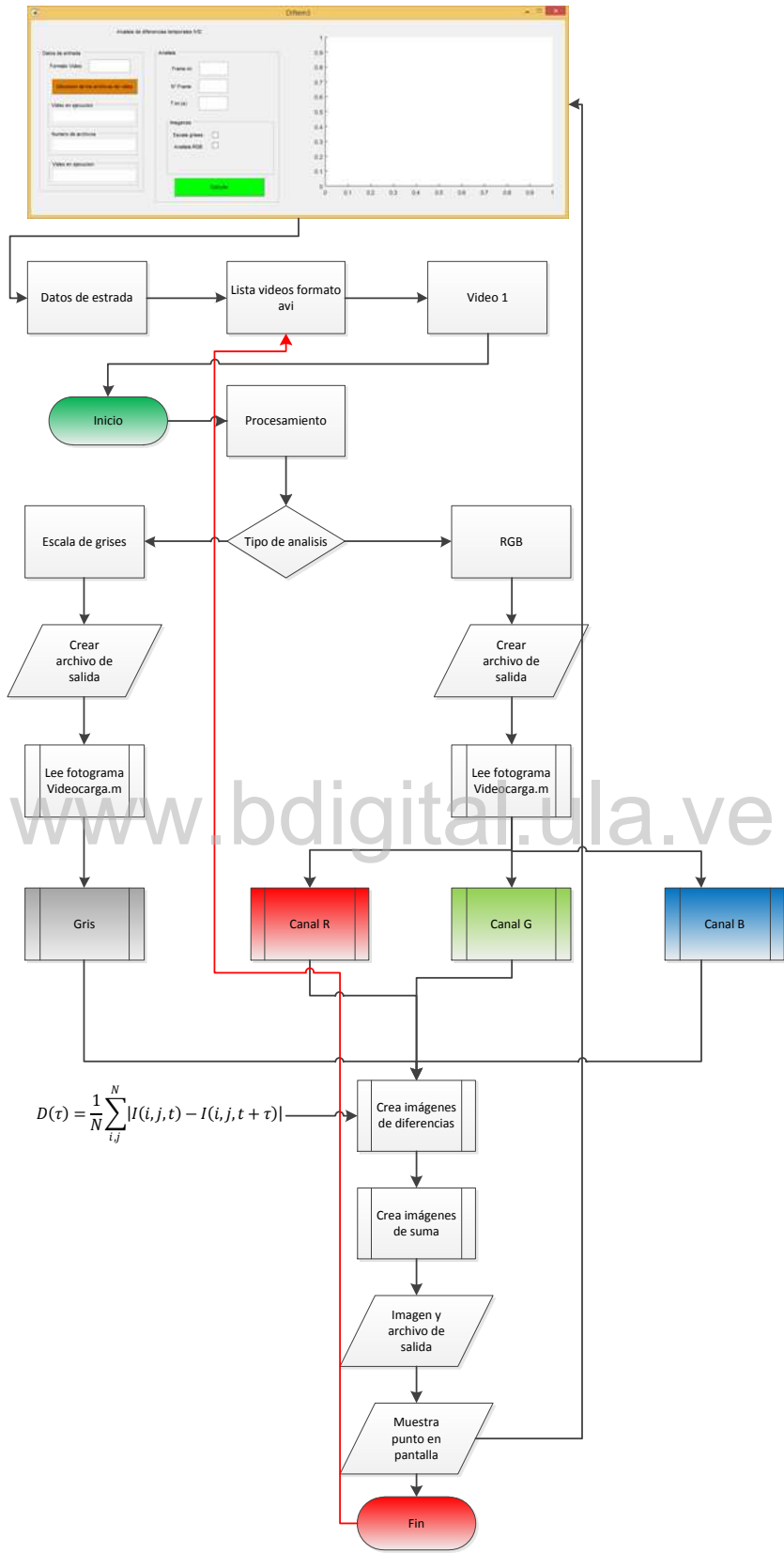


Figura 38 Flujograma para el procesamiento de los videos por el método de las diferencias temporales.

3.6.4 Análisis granulométrico

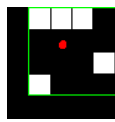
La granulometría es una técnica que se utiliza para obtener información física, sobre las estructuras presentes en una imagen tal como tamaño, diámetro, inclinación, etc. Es apropiada para la caracterización de imágenes de acuerdo a las dimensiones y formas de los objetos presentes en ellas, como en el caso de su aplicación para la clasificación de imágenes de speckle dinámico. Sobre todo, para análisis de textura (109). Aquí se aplica el método granulométrico a los videos originales en escalas de grises, a los de alta intensidad y a los de baja intensidad, últimos dos productos del proceso de segmentación propuesto en la anteriormente. Los cálculos granulométricos se hacen a través de las funciones ofrecidas en el *toolbox* de procesamiento de imágenes de Matlab®.

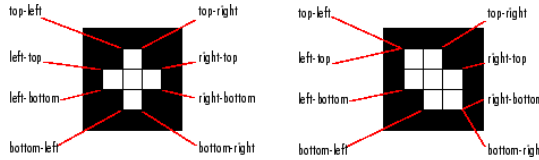
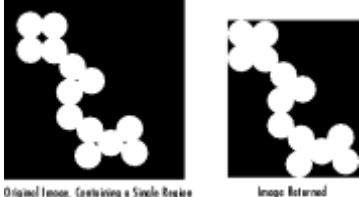
El programa para el análisis granulométrico de Matlab® lleva por nombre principal.m donde se hace un llamado a la función diametro10.m, en esta función se hace el procedimiento de lectura del video fotograma a fotograma, a través de la función videocarga.m, transformando la imagen a escala de grises y luego se realiza la binarización con el método de ajuste grueso y fino del umbral, pero esta vez solo se hace para 3 fotogramas, correspondientes a los ubicados en el 25, 50 y 75 % de la duración del video, como finalidad de encontrar el valor promedio del mismo en esas 3 imágenes. Aplicando este umbral óptimo a cada uno de los fotogramas del video, siendo este proceso de gran importancia para la disminución de los tiempos de cálculo computacional, mostrándose en los resultados, que estas variaciones en el umbral no afectan considerablemente el análisis que se realiza, es decir se puede suponer el valor del umbral como una constante para cada video analizado.



Una vez binarizados todos los fotogramas se utilizó la función *bwlabeln* del ITP para la detección de objetos, esta función realiza una conectividad igual a 8, esto es, para cada pixel con valor igual a 1, se evalúan los 8 pixeles vecinos a su alrededor y los que posean también el valor de 1, son reconocidos como un solo objeto, en este caso como un grano de speckle, entonces esta función se encarga de asignarle a cada objeto encontrado un valor escalar y guardarlo en una matriz, con el siguiente orden: etiqueta como cero al fondo, 1 para todos los pixeles pertenecientes al objeto 1, 2 para todos los pixeles pertenecientes al objeto 2 y así sucesivamente hasta completar todos los objetos identificados en la imagen.

Una vez creada la conectividad (es decir la identificación de los objetos), se procede a calcular los parámetros geométricos de los objetos etiquetados mediante la función *regionprops*, dichos parámetros son “*area*” para el área, “*EquivDiameter*” para el diámetro equivalente, “*MajorAxisLength*” semi eje mayor, “*MinorAxisLength*” semi eje menor, “*Orientation*” orientación (ángulo), “*Eccentricity*” excentricidad, todos medidos en pixeles, número de objetos detectados los cuales a partir de ahora llamaremos como números de motas y el “*MeanIntensity*” intensidad media del objeto referida a la imagen original en escalas de grises. Esta herramienta permite el cálculo de una gran variedad de variables, las cuales son descritas en la Tabla 2 y pueden ser de utilidad en trabajos posteriores.

Tabla 2 Parámetros geométricos que se pueden determinar con el comando `regionprops` (110).

Nombre de la propiedad	Descripción
'Area'	Número real de píxeles en la región, devuelto como escalar. (Este valor puede diferir ligeramente del valor devuelto por <code>bwarea</code> , que pondera diferentes patrones de píxeles de manera diferente).
'BoundingBox'	Posición y tamaño del cuadro más pequeño que contiene la región, devuelto como un vector 1 por (2 * Q). Los primeros elementos Q son las coordenadas de la esquina mínima de la caja. Los segundos elementos Q son el tamaño de la caja a lo largo de cada dimensión. Por ejemplo, un cuadro delimitador 2-D con valor [5.5 8.5 11 14] indica que la coordenada (x, y) de la esquina superior izquierda del cuadro es (5.5, 8.5), el ancho horizontal del cuadro es 11 píxeles y la altura vertical del cuadro es de 14 píxeles.
'Centroid'	Centro de masa de la región, devuelto como un vector 1 por Q. El primer elemento de Centroide es la coordenada horizontal (o coordenada x) del centro de masa. El segundo elemento es la coordenada vertical (o coordenada y). Todos los demás elementos de Centroide están en orden de dimensión. Esta figura ilustra el centroide y el cuadro delimitador de una región no contigua. La región está formada por píxeles blancos; el cuadro verde es el cuadro delimitador y el punto rojo es el centroide. 
'ConvexArea'	Redondez de objetos, devuelto como una estructura con el campo Circularidad. La estructura contiene el valor de circularidad para cada objeto en la imagen de entrada. El valor de circularidad se calcula como $(4 * \text{Área} * \pi) / (\text{Perímetro}^2)$. Para un círculo perfecto, el valor de circularidad es 1. La entrada debe ser una matriz de etiquetas o una imagen binaria con regiones contiguas. Si la imagen contiene regiones no contiguas, <code>regionprops</code> devuelve resultados inesperados.
'ConvexHull'	Número de píxeles en <code>ConvexImage</code> , devuelto como escalar.
'ConvexImage'	Polígono convexo más pequeño que puede contener la región, devuelto como una matriz p-por-2. Cada fila de la matriz contiene las coordenadas x e y de un vértice del polígono.
'Circularity'	Imagen que especifica el casco convexo, con todos los píxeles dentro del casco rellenos (activados), devuelta como una imagen binaria (lógica). La imagen es del tamaño del cuadro delimitador de la región. (Para los píxeles por los que pasa el límite del casco, <code>regionprops</code> usa la misma lógica que <code>roipoly</code> para determinar si el píxel está dentro o fuera del casco).
'Eccentricity'	Excentricidad de la elipse que tiene los mismos segundos momentos que la región, devuelta como un escalar. La excentricidad es la relación de la distancia entre los focos de la elipse y la longitud de su eje mayor. El valor está entre 0 y 1. (0 y 1 son casos degenerados. Una elipse cuya excentricidad es 0 es en realidad un círculo, mientras que una elipse cuya excentricidad es 1 es un segmento de línea).
'EquivDiameter'	Diámetro de un círculo con la misma área que la región, devuelto como escalar. Calculado como $\sqrt{4 * \text{Área} / \pi}$.
'EulerNumber'	Número de objetos en la región menos el número de agujeros en esos objetos, devuelto como un escalar. Esta propiedad solo se admite para matrices de etiquetas 2-D. <code>regionprops</code> usa conectividad 8 para calcular el número de Euler (también conocido como la característica de Euler). Para obtener más información sobre la conectividad, consulte Conectividad de píxeles.
'Extent'	Proporción de píxeles en la región a píxeles en el cuadro delimitador total, devuelto como un escalar. Calculado como el Área dividida por el área del cuadro delimitador.

'Extrema'	<p>Puntos extremos en la región, devueltos como una matriz de 8 por 2. Cada fila de la matriz contiene las coordenadas x e y de uno de los puntos. El formato del vector es [arriba a la izquierda, arriba a la derecha, arriba a la derecha, abajo, abajo, derecha, abajo, izquierda, abajo, izquierda, arriba]. Esta figura ilustra los extremos de dos regiones diferentes. En la región de la izquierda, cada punto extremo es distinto. En la región de la derecha, ciertos puntos extremos (como arriba a la izquierda y arriba a la izquierda) son idénticos.</p> 								
'FilledArea'	Número de píxeles en FilledImage, devuelto como escalar.								
'FilledImage'	<p>Imagen del mismo tamaño que el cuadro delimitador de la región, devuelta como una matriz binaria (lógica). Los píxeles en corresponden a la región, con todos los huecos rellenos, como se muestra en esta figura.</p> 								
'Image'	Imagen del mismo tamaño que el cuadro delimitador de la región, devuelta como una matriz binaria (lógica). Los píxeles activados corresponden a la región y todos los demás píxeles están desactivados.								
'MaxFeretProperties'	<p>Propiedades de Feret que incluyen el diámetro máximo de Feret, su ángulo relativo y valores de coordenadas, devueltos como una estructura con campos:</p> <table border="1" data-bbox="483 915 1396 1178"> <thead> <tr> <th>Campo</th> <th>Descripción</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MaxFeretDiameter</td> <td>Diámetro máximo de Feret medido como la distancia máxima entre dos puntos de límite en los vértices antípodas del casco convexo que encierran el objeto.</td> </tr> <tr> <td>MaxFeretAngle</td> <td>Ángulo del diámetro máximo de Feret con respecto al eje horizontal de la imagen.</td> </tr> <tr> <td>MaxFeretCoordinates</td> <td>Coordenadas del punto final del diámetro máximo de Feret.</td> </tr> </tbody> </table> <p>La entrada puede ser una imagen binaria, un componente conectado o una matriz de etiquetas.</p>	Campo	Descripción	MaxFeretDiameter	Diámetro máximo de Feret medido como la distancia máxima entre dos puntos de límite en los vértices antípodas del casco convexo que encierran el objeto.	MaxFeretAngle	Ángulo del diámetro máximo de Feret con respecto al eje horizontal de la imagen.	MaxFeretCoordinates	Coordenadas del punto final del diámetro máximo de Feret.
Campo	Descripción								
MaxFeretDiameter	Diámetro máximo de Feret medido como la distancia máxima entre dos puntos de límite en los vértices antípodas del casco convexo que encierran el objeto.								
MaxFeretAngle	Ángulo del diámetro máximo de Feret con respecto al eje horizontal de la imagen.								
MaxFeretCoordinates	Coordenadas del punto final del diámetro máximo de Feret.								
'MinFeretProperties'	<p>Propiedades de Feret que incluyen el diámetro mínimo de Feret, su ángulo relativo y valores de coordenadas, devueltos como una estructura con campos:</p> <table border="1" data-bbox="483 1314 1396 1577"> <thead> <tr> <th>Campo</th> <th>Descripción</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MinFeretDiameter</td> <td>Diámetro máximo de Feret medido como la distancia máxima entre dos puntos de límite en los vértices antípodas del casco convexo que encierran el objeto.</td> </tr> <tr> <td>MinFeretAngle</td> <td>Ángulo del diámetro máximo de Feret con respecto al eje horizontal de la imagen.</td> </tr> <tr> <td>MinFeretCoordinates</td> <td>Coordenadas del punto final del diámetro máximo de Feret.</td> </tr> </tbody> </table> <p>La entrada puede ser una imagen binaria, un componente conectado o una matriz de etiquetas.</p>	Campo	Descripción	MinFeretDiameter	Diámetro máximo de Feret medido como la distancia máxima entre dos puntos de límite en los vértices antípodas del casco convexo que encierran el objeto.	MinFeretAngle	Ángulo del diámetro máximo de Feret con respecto al eje horizontal de la imagen.	MinFeretCoordinates	Coordenadas del punto final del diámetro máximo de Feret.
Campo	Descripción								
MinFeretDiameter	Diámetro máximo de Feret medido como la distancia máxima entre dos puntos de límite en los vértices antípodas del casco convexo que encierran el objeto.								
MinFeretAngle	Ángulo del diámetro máximo de Feret con respecto al eje horizontal de la imagen.								
MinFeretCoordinates	Coordenadas del punto final del diámetro máximo de Feret.								
'MajorAxisLength'	Longitud (en píxeles) del eje mayor de la elipse que tiene los mismos segundos momentos centrales normalizados que la región, devuelta como un escalar.								
'MinorAxisLength'	Longitud (en píxeles) del eje menor de la elipse que tiene los mismos segundos momentos centrales normalizados que la región, devuelta como un escalar.								

'Orientation'	<p>Ángulo entre el eje x y el eje mayor de la elipse que tiene los mismos segundos momentos que la región, devuelto como un escalar. El valor está en grados, desde -90 grados a 90 grados. Esta figura ilustra los ejes y la orientación de la elipse. El lado izquierdo de la figura muestra una región de imagen y su elipse correspondiente. El lado derecho muestra la misma elipse con las líneas azules sólidas que representan los ejes. Los puntos rojos son los focos. La orientación es el ángulo entre la línea de puntos horizontal y el eje mayor.</p> 
'Perimeter'	<p>La distancia alrededor del límite de la región se devolvió como un escalar. regionprops calcula el perímetro calculando la distancia entre cada par de píxeles contiguos alrededor del borde de la región. Si la imagen contiene regiones no contiguas, regionprops devuelve resultados inesperados. Esta figura ilustra los píxeles incluidos en el cálculo del perímetro de este objeto.</p> 
'PixelIdxList'	<p>Índices lineales de los píxeles en la región, devueltos como un vector de elemento p.</p>
'PixelList'	<p>Ubicaciones de píxeles en la región, devueltas como una matriz p-por-Q. Cada fila de la matriz tiene la forma [x y z ...] y especifica las coordenadas de un píxel en la región.</p>
'Solidity'	<p>Proporción de píxeles del casco convexo que también se encuentran en la región, devuelta como escalar. Calculado como Area / ConvexArea.</p>
'SubarrayIdx'	<p>Elementos de L dentro del cuadro delimitador del objeto, devueltos como una matriz de celdas que contiene índices tales que L (idx {:}) extrae los elementos.</p>
'MaxIntensity'	<p>Valor del píxel con mayor intensidad en la región, devuelto como escalar.</p>
'MeanIntensity'	<p>Media de todos los valores de intensidad en la región, devuelta como escalar.</p>
'MinIntensity'	<p>Valor del píxel con la intensidad más baja de la región, devuelto como escalar.</p>
'PixelValues'	<p>Número de píxeles en la región, devuelto como un vector p-por-1, donde p es el número de píxeles en la región. Cada elemento del vector contiene el valor de un píxel en la región.</p>
'WeightedCentroid'	<p>Centro de la región según la ubicación y el valor de intensidad, devuelto como un vector de coordenadas p-por-Q. El primer elemento de WeightedCentroid es la coordenada horizontal (o coordenada x) del centroide ponderado. El segundo elemento es la coordenada vertical (o coordenada y). Todos los demás elementos de WeightedCentroid están en orden de dimensión.</p>

Tendremos entonces para cada fotograma cierta cantidad de motas detectadas, con sus respectivos valores granulométricos. Para mejorar las estadísticas, sometemos a estos datos a una depuración, y conservamos solo aquellos valores que se encuentran entre el percentil 20 y el percentil 85 de las medidas. Finalmente se calcula el promedio de cada parámetro para cada fotograma y a su vez el promedio entre todos los fotogramas, obteniendo así un solo valor por video por parámetro. Recordemos que hay 3 videos originales por cada muestra y por tanto 3 videos de alta intensidad y 3 de baja intensidad. Nuevamente se saca el promedio entre los tres y finalmente se obtienen tres valores por muestra por parámetro, uno para el video original, el segundo correspondiente al video de alta intensidad y el tercero para el de baja intensidad. El diagrama de flujo de este análisis de granulometría lo podemos observar en la Figura 39.

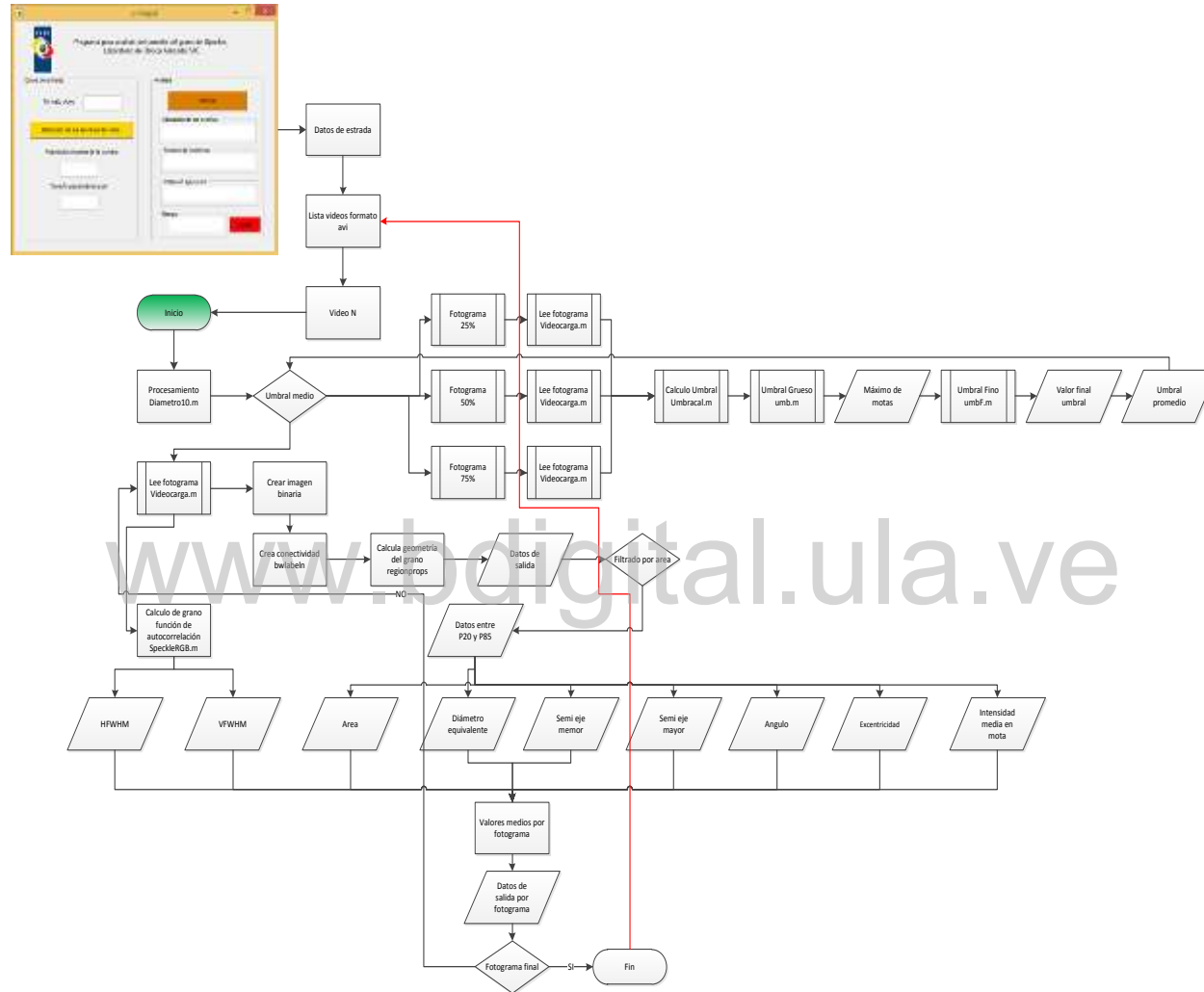


Figura 39 Flujograma de cálculos granulométricos.

Los resultados de las variables a ser calculadas, serán codificados como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Codificación de las variables utilizadas.

Variables	Unidades	Código
Intensidad por método de diferencias temporales	(U.A)	I
Umbral de binarización (normalizado)	(U.A)	Umb
Área de la mota	Píxeles	Area
Diámetro equivalente	Píxeles	Diametro
Número de motas	#	nRegSel
Semieje mayor	Píxeles	SeMax
Semieje menor	Píxeles	SeMin
Ángulo entre el eje x y el eje mayor de la elipse	°	Alfa
Excentricidad	(U.A)	Exen
Media de todos los valores de intensidad en la mota	(U.A)	meanInt
Ancho medio a mitad de la campana horizontal	Píxeles	HFWHM
Ancho medio a mitad de la campana vertical	Píxeles	VFWHM
Ancho medio a mitad de la campana promedio	Píxeles	FWHMM

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 4

Resultados y discusiones

4.1 Selección de los parámetros de adquisición de datos

Inicialmente se hizo la caracterización del experimento en función de la respuesta de la cámara CCD, con la finalidad de definir la respuesta de los sistemas de medición y optimizar así el procesado. De importancia fue definir los parámetros de tiempo de exposición, la potencia máxima del láser permitida por el sensor CCD sin que se sature, la calidad de las imágenes más acorde a la capacidad de almacenamiento del PC y la cantidad de fotogramas por segundo. El valor de estos parámetros podemos encontrarlos en la Tabla 4.

Tabla 4 Parámetros para la adquisición de datos óptima.

Parámetro	Unidades	Valor
FPS	Fotogramas/s	5
Tiempo de exposición	ms	120
Calidad	%	40
Tiempo de adquisición	s	40
Número de fotogramas	#	200

Debido a que la respuesta de la cámara CCD depende de la longitud de onda incidente, esta respuesta fue mejor con el láser verde tal como se puede observar en Figura 22, Figura 23, Figura 24 y Figura 25, es por esto que decidimos trabajar únicamente con esta longitud de onda en el experimento, con una potencia de salida de $(20,72 \pm 0,55) \mu\text{W}$, con un coeficiente de variación de 2,65%, medido a la entrada de la muestra, con un medidor de potencia marca ThorLab, modelo PM100A acoplado a un sensor S120VC para un rango de 50 nW a 50 mW con una apertura de 9,5 mm.



Figura 40 Muestra utilizada y agua destilada, para realizar diluciones V/V.

Con estos parámetros se tomaron 3 videos por muestra de granos de kéfir diluido en agua destilada variando las concentraciones %V/V, para un total de 15 muestras con variaciones de concentración y una muestra de control de solo agua destilada. Haciendo un total de 48 videos. Las muestras y la concentración por volumen relativo podemos observarlas en la Tabla 5 y Figura 40. Utilizando una micropipeta, Thermo Scientific, con un rango de (0,2 a 20 ml), con un error absoluto de 0,01 ml.

Tabla 5 Muestras de concentraciones por volumen relativo.

Muestra	Concentración (%)	Volumen muestra inicial (ml)	Volumen agua destilada (ml)
1	100	15,00	0
2	95	14,25	0,75
3	90	13,50	1,50
4	85	12,75	2,25
5	80	12,00	3,00
6	75	11,25	3,75
7	70	10,50	4,50
8	65	9,75	5,25
9	60	9,00	6,00
10	55	8,25	6,75
11	50	7,50	7,50
12	45	6,75	8,25
13	40	6,00	9,00
14	35	5,25	9,75
15	30	4,50	10,50
16	0	0	15,00

4.2 Análisis de intensidades.

Una vez realizado el proceso de segmentación, se hizo un análisis de intensidad a través del método de las diferencias temporales, a los 3 grupos de videos y se graficó la variación de la intensidad en función de la concentración %V/V. Recordemos que por muestra hay tres videos por grupo, y cada punto en la gráfica es el promedio de los 3. Los resultados obtenidos de la diferencia temporal se pueden apreciar en la Tabla 6 y la gráfica de las curvas en la Figura 41.

En la Figura 41 podemos observar la gráfica en donde se comparan las variaciones de la intensidad de los 3 grupos de videos y se puede apreciar que se obtuvo una correlación lineal, las pendientes son negativas y era de esperarse ya que por ser un montaje de speckle por transmisión la intensidad disminuye con la concentración ya que el haz luminoso en su trayectoria atraviesa una muestra más densa. Si

comparamos los ajustes obtenidos para los tres tipos de videos el valor de R^2 mejora considerablemente entre la curva obtenida en el procesamiento convencional (análisis aplicado al video original) de 0,64 a 0,90 que es el obtenido en el de los videos de alta intensidad, también mejora la señal, aumentando el valor del pixel medio de la imagen obtenida por este método. A pesar de que, en los videos de baja intensidad, se tiene una poca relación señal ruido, también mejora el ajuste obtenido, por lo tanto, procesamiento por segmentación mejora los resultados obtenidos, en comparación con los datos originalmente adquiridos.

Tabla 6 Variación de la concentración relativa V/V y la intensidad.

N°	Concentración V/V	Original			Alta intensidad			Baja Intensidad				
		I (U.A)	±des	CV%	I (U.A)	±des	CV%	I (U.A)	±des	CV%		
1	0	1982	322	16,25	2385	298	12,49	1988	161	8,10		
2	30	2875	129	4,49	3174	120	3,78	2315	44	1,90		
3	35	3054	151	4,94	3321	126	3,79	2304	30	1,30		
4	40	3011	105	3,49	3294	93	2,82	2210	27	1,22		
5	45	3020	45	1,49	3293	53	1,61	2228	27	1,21		
6	50	3015	51	1,69	3290	37	1,12	2168	14	0,65		
7	55	3056	103	3,37	3356	58	1,73	2256	31	1,37		
8	60	3050	35	1,15	3345	39	1,17	2255	54	2,39		
9	65	3038	18	0,59	3305	9	0,27	2157	6	0,28		
10	70	2931	47	1,60	3235	14	0,43	2103	33	1,57		
11	75	2995	86	2,87	3246	164	5,05	1994	3	0,15		
12	80	3022	27	0,89	3296	22	0,67	2067	8	0,39		
13	85	2849	103	3,62	3132	83	2,65	1943	38	1,96		
14	90	2638	106	4,02	3029	96	3,17	1923	23	1,20		
15	95	2874	77	2,68	3216	57	1,77	1974	43	2,18		
16	100	2750	22	0,80	3091	6	0,19	1929	2	0,10		
Promedio Original				3,37	Promedio Alta			2,67	Promedio Baja			1,62

Hay que destacar que en el ajuste mostrado en la Figura 41, el valor de control (concentración cero), no fue tomado en consideración para el ajuste lineal, debido a que la muestra utilizada no es transparente y el control si lo es, al presentarse un cambio en el índice de refracción, se observa un cambio en la intensidad, teniendo como consecuencia que el valor obtenido por el ajuste como corte, no coincide con el valor obtenido para la concentración igual a cero. También se puede observar que los valores obtenidos por el filtrado por segmentación disminuyen la dispersión de los datos obtenidos.

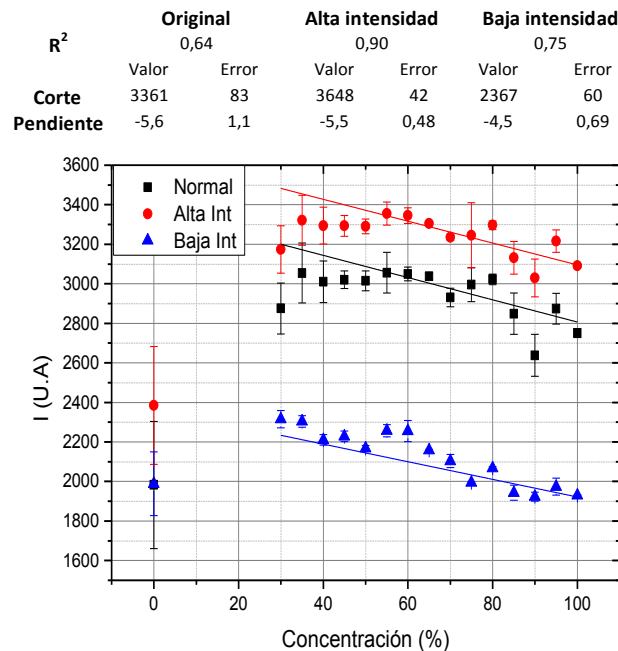


Figura 41 Variación de la concentración relativa V/V y la intensidad.

4.3 Análisis Granulométrico

4.3.1 Selección del umbral para el análisis granulométrico

La selección del umbral, es uno de los parámetros de mayor interés, en el proceso de segmentación, ya que debe ser calculado para cada fotograma, lo que representa una gran inversión de tiempo de cálculo computacional. Con la finalidad de obtener una optimización y hacer una reducción del tiempo de cálculo, se realizaron un conjunto de pruebas previas al presente trabajo, para la determinación del umbral óptimo. En un trabajo realizado en conjunto con el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, a cargo de los profesores Efren Andrades y Cristina Grassi y Carlos Leal del Laboratorio de Óptica Aplicada del IVIC (datos que se encuentran en proceso de publicación), se realiza un estudio para estimar cual es el rango máximo de variación del umbral y que tanto afectan los datos granulométricos obtenidos. Estos datos se emplean exclusivamente, para la determinación del procedimiento del cálculo de umbral, utilizado en el procesamiento granulométrico del presente trabajo.

Tabla 7 Variación del diámetro equivalente en función del umbral.

Video	Min	Auto	Max	Promedio	CV%	Diámetro medio (pixeles)	±des	CV%
Muestra 1	0,53	0,56187	0,59	0,560	4,05	4,05	0,15	3,83
Muestra 2	0,53	0,55925	0,59	0,560	3,92	3,92	0,14	3,54
Muestra 3	0,53	0,56317	0,59	0,560	3,79	3,79	0,12	3,28
Muestra 4	0,53	0,51071	0,59	0,554	3,98	3,98	0,22	5,47

Muestra 5	0,53	0,55926	0,59	0,560	3,96	3,96	0,13	3,40
Muestra 6	0,53	0,56447	0,59	0,561	4,28	4,28	0,14	3,34
Muestra 7	0,53	0,54234	0,59	0,558	3,58	3,58	0,16	4,51

La primera prueba consistió en estimar el umbral medio, en los fotogramas de los videos, ubicados en el 25%, 50% y 75 % de la duración del mismo, utilizando para el análisis granulométrico de todos los fotogramas del video, el valor medio del umbral de las imágenes seleccionadas, siendo denominado umbral automático. Se fijan 7 valores del umbral, que difieran en la centésima para 7 valores, con la finalidad de ver la variación del diámetro estimado, ya que este es uno de los parámetros de mayor interés. Los resultados de esta prueba se pueden observar en la Tabla 7, donde se muestra el valor mínimo del umbral, el automático, máximo, promedio y las variaciones del diámetro. Se puede observar que las variaciones en el umbral, se encuentran entre el 3,58% a 4,28%, para las diferentes muestras, representan una variación en el diámetro entre el 3,28% a 5,47%.

Teniendo como premisa esto, se realiza una comparación, entre los valores promedio del umbral calculado a partir de su valor en cada uno de los fotogramas, y el automático, siendo mostrados en la Tabla 8, en la que se puede observar que los coeficientes de variación para el umbral automático tienden a ser un poco mayor, que los obtenidos fotograma a fotograma. El CV% para el umbral automático se encuentre entre el 0,71% a 1,19 %, mientras que el calculado fotograma a fotograma entre el 0,75% y 1,56 %, es decir que la diferencia es menor al 2%. Si las variaciones del valor de umbral utilizado son del orden del 2%, podemos inferir que la variación del diámetro será de este mismo orden.

Tabla 8 Comparación entre el umbral medio por cada fotograma y el calculado automáticamente.

Video	N° fotogramas	Umbral automático			Umbral fotograma a fotograma			% Dif
		Umbral promedio (umbralCal.m)	±des	CV%	Umbral promedio	±des	CV%	
Muestra 1	220	0,56187	0,00596	1,06	0,56288	0,00424	0,75	-0,18
Muestra 2	228	0,55925	0,00748	1,34	0,56206	0,00445	0,79	-0,50
Muestra 3	225	0,56317	0,00398	0,71	0,55799	0,00549	0,98	0,92
Muestra 4	238	0,51071	0,00587	1,15	0,51284	0,00802	1,56	-0,42
Muestra 5	225	0,55926	0,00498	0,89	0,55792	0,00606	1,09	0,24
Muestra 6	230	0,56447	0,00399	0,71	0,56223	0,00559	0,99	0,40
Muestra 7	224	0,54234	0,00643	1,19	0,54166	0,00451	0,83	0,13

Otro punto de interés es comparar los valores obtenidos en el cálculo del umbral grueso (número de motas vs umbral), realizando el ajuste de una función bigaussiana, expresado en la (0.114) y mostrado en la Figura 42

$$\begin{aligned} (X < xc) &\Rightarrow y = y_0 + He^{-((x-xc)^2/2W_1^2)} \\ (X \geq xc) &\Rightarrow y = y_0 + He^{-((x-xc)^2/2W_2^2)} \end{aligned} \quad (0.115)$$

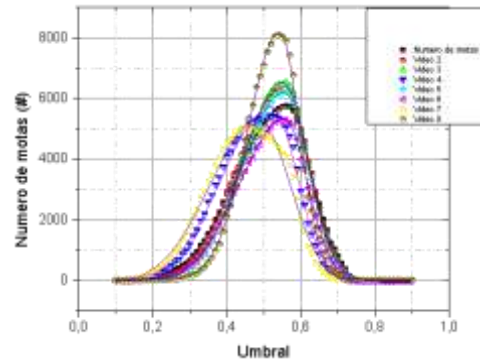


Figura 42 Ajuste función bigaussiana para variación del número de motas vs el umbral.

De los ajustes obtenidos en la Figura 42, el parámetro que es de nuestro interés es el valor de x_c o centro de la función bigaussiana, representando el valor del umbral obtenido por el ajuste de dicha función, y comparándola con el umbral automático, esto se muestra en la Tabla 9, obteniéndose valores similares, sin superar el $\pm 2\%$ de porcentaje diferencia. Por lo que los resultados del umbral obtenidos mediante el método propuesto, es semejante a los valores obtenidos mediante el ajuste de una función, la diferencia radica en el tiempo de cómputo.

Tabla 9 Comparación entre el valor del umbral calculado y el obtenido por el ajuste de la función bigaussiana.

video	x_c	error	R^2	Umbral calculado	% dif
Muestra 1	0,55928	0,00088	0,999	0,56187	0,46
Muestra 2	0,55512	0,00078	0,999	0,55925	0,74
Muestra 3	0,55229	0,00063	0,999	0,56317	1,97
Muestra 4	0,52091	0,00216	0,995	0,51071	-1,96
Muestra 5	0,55457	0,00071	0,999	0,55926	0,85
Muestra 6	0,55581	0,00079	0,999	0,56447	1,56
Muestra 7	0,54198	0,00085	0,999	0,54234	0,07

Debido a la poca variación entre los parámetros geométricos de la granulometría para cambios pequeños en el umbral, se decide para simplificar el proceso de cálculo computacional no calcular el umbral para cada fotograma, por lo que este se calcula solamente para 3 fotogramas, utilizando como una constante para el análisis de todos los fotogramas de un video, el valor medio obtenido del mismo.

4.3.2 Calculo de parámetros granulométricos

Tabla 10 Resultado análisis granulométrico.

Procesado Video Originales																		
Concentración V/V	Umb (U.A)	±des	CV%	Área (Píxeles)	±des	CV%	Diámetro (Píxeles)	±des	CV%	nRegSel (#)	±des	CV%	SeMax (Píxeles)	±des	CV%	SeMin (Píxeles)	±des	CV%
0	0,18856	0,00460	2,44	15,45	0,86	5,60	4,21	0,10	2,46	4822	155	3,21	5,87	0,19	3,32	3,51	0,07	1,91
30	0,17330	0,00275	1,59	13,78	0,20	1,47	3,97	0,03	0,84	5305	58	1,09	5,53	0,04	0,64	3,32	0,03	1,01
35	0,16634	0,00150	0,90	13,50	0,17	1,27	3,92	0,03	0,73	5505	210	3,81	5,46	0,02	0,45	3,28	0,03	0,92
40	0,15762	0,00197	1,25	13,38	0,22	1,65	3,90	0,03	0,77	5660	35	0,63	5,45	0,05	0,94	3,26	0,02	0,73
45	0,16191	0,00259	1,60	13,35	0,29	2,18	3,90	0,04	0,97	5521	210	3,80	5,42	0,07	1,37	3,27	0,02	0,67
50	0,15458	0,00199	1,29	13,28	0,12	0,91	3,88	0,02	0,39	5524	170	3,07	5,42	0,04	0,67	3,25	0,01	0,26
55	0,16188	0,00335	2,07	13,21	0,24	1,80	3,88	0,03	0,84	5476	210	3,83	5,40	0,05	0,94	3,24	0,02	0,69
60	0,16061	0,00588	3,66	13,47	0,10	0,77	3,91	0,02	0,42	5373	311	5,78	5,46	0,03	0,53	3,26	0,02	0,48
65	0,15198	0,00199	1,31	13,25	0,39	2,91	3,88	0,05	1,40	5628	118	2,09	5,40	0,08	1,48	3,26	0,04	1,32
70	0,14721	0,00398	2,70	13,30	0,09	0,71	3,88	0,01	0,30	5434	116	2,14	5,45	0,02	0,43	3,23	0,01	0,28
75	0,14893	0,01016	6,82	12,91	1,04	8,09	3,83	0,14	3,71	5603	600	10,70	5,36	0,23	4,29	3,20	0,10	3,09
80	0,14634	0,00130	0,89	12,83	0,21	1,66	3,82	0,03	0,81	5666	79	1,40	5,32	0,05	0,89	3,20	0,03	0,82
85	0,13755	0,00318	2,31	12,59	0,08	0,61	3,79	0,01	0,27	6035	62	1,03	5,28	0,01	0,21	3,18	0,01	0,37
90	0,13544	0,00379	2,80	12,82	0,55	4,27	3,82	0,07	1,83	5754	142	2,47	5,34	0,14	2,60	3,20	0,05	1,45
95	0,13914	0,00353	2,54	12,43	0,33	2,65	3,77	0,04	1,14	5831	108	1,85	5,24	0,07	1,40	3,16	0,03	1,01
100	0,13719	0,00347	2,53	12,55	0,32	2,54	3,78	0,04	1,14	6055	12	0,20	5,27	0,08	1,44	3,18	0,03	1,00
Concentración V/V	Alfa (°)	±des	CV%	Exen (U.A)	±des	CV%	HFWHM (Píxeles)	±des	CV%	VFWHM (Píxeles)	±des	CV%	FWHMM (Píxeles)	±des	CV%	meanInt (U.A)	±des	CV%
0	6,40	1,13	17,69	0,7065	0,0064	0,90	5,11	0,23	4,45	4,55	0,04	0,82	4,83	0,39	8,17	63,22	2,04	3,22
30	6,06	1,85	30,57	0,7071	0,0024	0,34	4,50	0,08	1,81	4,74	0,10	2,17	4,62	0,18	3,79	57,20	0,70	1,22
35	7,76	1,14	14,63	0,7057	0,0032	0,45	4,42	0,07	1,55	4,69	0,15	3,25	4,55	0,20	4,30	55,26	0,10	0,18
40	4,63	0,53	11,38	0,7074	0,0015	0,21	4,41	0,04	0,83	4,59	0,08	1,74	4,50	0,13	2,89	52,68	0,53	1,02
45	3,51	1,45	41,37	0,7048	0,0033	0,46	4,53	0,11	2,51	4,56	0,10	2,30	4,55	0,02	0,39	53,87	1,15	2,13
50	5,72	2,19	38,30	0,7078	0,0023	0,33	4,51	0,07	1,62	4,63	0,11	2,31	4,57	0,09	1,87	50,96	0,67	1,31
55	6,89	2,24	32,53	0,7071	0,0013	0,19	4,50	0,10	2,31	4,66	0,09	1,84	4,58	0,11	2,39	53,38	1,38	2,58
60	2,70	0,55	20,55	0,7085	0,0033	0,46	4,94	0,32	6,58	4,42	0,08	1,71	4,68	0,37	7,86	52,92	1,40	2,64
65	3,65	0,87	23,95	0,7038	0,0018	0,26	4,57	0,07	1,45	4,47	0,04	0,82	4,52	0,08	1,68	50,78	0,87	1,72
70	5,71	0,56	9,75	0,7116	0,0021	0,29	4,45	0,06	1,27	4,86	0,06	1,18	4,65	0,29	6,26	48,40	1,60	3,31
75	3,09	2,38	76,90	0,7077	0,0068	0,96	4,70	0,13	2,76	4,44	0,51	11,58	4,57	0,18	3,93	49,33	2,29	4,65
80	1,14	0,99	86,50	0,7055	0,0011	0,16	4,50	0,05	1,02	4,48	0,04	0,85	4,49	0,02	0,34	48,35	0,51	1,06
85	3,99	0,48	11,93	0,7032	0,0005	0,07	4,48	0,07	1,59	4,18	0,02	0,53	4,33	0,21	4,88	45,55	0,69	1,52
90	6,10	0,77	12,68	0,7079	0,0055	0,77	4,38	0,05	1,09	4,58	0,16	3,54	4,48	0,14	3,07	43,55	1,57	3,60
95	4,33	1,06	24,51	0,7038	0,0021	0,29	4,38	0,06	1,46	4,43	0,05	1,20	4,40	0,04	0,95	45,66	1,46	3,20
100	4,04	0,43	10,55	0,7030	0,0018	0,26	4,49	0,03	0,61	4,15	0,01	0,20	4,32	0,24	5,58	45,12	0,68	1,51

Procesado Vides filtrados por segmentación para alta intensidad																		
Concentración V/V	Umb (U.A)	±des	CV%	Área (Píxeles)	±des	CV%	Diámetro (Píxeles)	±des	CV%	nRegSel (#)	±des	CV%	SeMax (Píxeles)	±des	CV%	SeMin (Píxeles)	±des	CV%
0	0,21427	0,02792	13,03	10,26	2,22	21,67	3,38	0,39	11,65	5032	27	0,54	4,80	0,48	10,09	2,84	0,34	12,09
30	0,17893	0,02270	12,69	10,75	2,11	19,62	3,48	0,37	10,76	5264	109	2,07	4,93	0,47	9,60	2,92	0,32	11,01
35	0,18897	0,01746	9,24	9,21	1,55	16,82	3,21	0,28	8,82	5456	355	6,51	4,58	0,37	8,00	2,70	0,25	9,25
40	0,17812	0,02099	11,78	9,28	1,87	20,20	3,23	0,34	10,53	5576	152	2,73	4,60	0,43	9,39	2,71	0,30	11,03
45	0,17544	0,01785	10,17	10,02	1,78	17,80	3,36	0,34	10,00	5337	59	1,10	4,77	0,42	8,73	2,83	0,30	10,64
50	0,15764	0,00074	0,47	10,71	0,09	0,88	3,50	0,02	0,62	5189	124	2,38	4,96	0,01	0,28	2,94	0,02	0,81
55	0,17803	0,04105	23,06	9,53	3,43	36,01	3,25	0,61	18,62	5292	164	3,10	4,61	0,75	16,22	2,72	0,51	18,91
60	0,18683	0,02497	13,37	8,88	2,01	22,69	3,15	0,37	11,88	5286	306	5,78	4,51	0,49	10,95	2,64	0,32	12,31
65	0,17116	0,02179	12,73	9,23	1,86	20,18	3,22	0,34	10,53	5536	110	1,98	4,57	0,42	9,20	2,70	0,30	11,04
70	0,18331	0,00497	2,71	7,50	0,28	3,69	2,89	0,06	2,01	5428	111	2,04	4,17	0,07	1,79	2,41	0,05	2,10
75	0,15097	0,03704	24,53	10,48	2,17	20,69	3,44	0,41	11,90	5398	230	4,27	4,85	0,47	9,67	2,89	0,36	12,43
80	0,14717	0,02160	14,68	10,52	2,25	21,36	3,45	0,40	11,59	5398	302	5,59	4,87	0,50	10,22	2,90	0,35	11,89
85	0,13806	0,00420	3,04	10,37	0,56	5,42	3,45	0,09	2,73	5625	12	0,21	4,85	0,11	2,37	2,91	0,08	2,63
90	0,14631	0,02376	16,24	9,01	2,50	27,79	3,18	0,46	14,41	5584	58	1,04	4,53	0,55	12,04	2,66	0,40	15,18
95	0,14805	0,03011	20,34	9,39	2,91	30,98	3,25	0,52	16,01	5626	167	2,98	4,60	0,62	13,54	2,72	0,45	16,61
100	0,13849	0,02946	21,27	9,77	2,83	28,99	3,31	0,50	15,05	5942	253	4,26	4,67	0,60	12,77	2,78	0,43	15,41
Concentración V/V	Alfa (°)	±des	CV%	Exen (U.A)	±des	CV%	HFWHM (Píxeles)	±des	CV%	VFWHM (Píxeles)	±des	CV%	FWHMM (Píxeles)	±des	CV%	meanInt (U.A)	±des	CV%
0	8,44	2,58	30,60	0,7260	0,0263	3,62	4,41	0,18	4,01	3,97	0,03	0,64	4,19	0,31	7,46	73,02	4,63	6,35
30	7,39	3,80	51,38	0,7154	0,0247	3,46	3,91	0,07	1,77	4,12	0,08	1,88	4,01	0,15	3,73	63,28	4,07	6,44
35	10,21	3,24	31,72	0,7313	0,0166	2,27	3,86	0,07	1,77	4,08	0,12	2,83	3,97	0,16	4,00	64,54	3,20	4,96
40	7,81	2,24	28,72	0,7300	0,0245	3,35	3,85	0,05	1,26	4,01	0,05	1,36	3,93	0,11	2,86	61,46	3,90	6,35
45	5,13	1,70	33,06	0,7164	0,0185	2,59	3,97	0,08	2,11	3,99	0,08	1,96	3,98	0,01	0,34	61,08	2,33	3,81
50	5,95	1,78	29,99	0,7137	0,0060	0,84	3,94	0,06	1,46	4,03	0,08	2,04	3,99	0,06	1,58	56,47	0,65	1,14
55	10,13	1,33	13,17	0,7161	0,0353	4,93	3,94	0,08	2,14	4,06	0,07	1,77	4,00	0,09	2,14	61,55	6,68	10,85
60	5,89	2,48	42,07	0,7278	0,0191	2,63	4,27	0,23	5,46	3,85	0,04	0,96	4,06	0,30	7,47	62,60	4,87	7,79
65	7,05	1,86	26,41	0,7264	0,0276	3,79	4,00	0,05	1,30	3,91	0,03	0,86	3,96	0,07	1,72	58,97	3,58	6,07
70	10,89	0,48	4,41	0,7346	0,0051	0,69	3,89	0,04	1,04	4,20	0,04	0,99	4,05	0,22	5,53	59,86	1,57	2,62
75	5,11	4,23	82,87	0,6994	0,0308	4,40	4,08	0,09	2,28	3,85	0,42	10,88	3,96	0,16	4,11	54,11	7,26	13,42
80	3,54	3,44	97,12	0,7086	0,0310	4,37	3,93	0,04	0,89	3,90	0,03	0,69	3,91	0,02	0,41	53,27	4,04	7,58
85	4,76	0,30	6,23	0,6995	0,0083	1,18	3,93	0,05	1,19	3,64	0,02	0,57	3,79	0,20	5,24	50,07	0,65	1,30
90	9,87	3,49	35,34	0,7228	0,0355	4,91	3,84	0,03	0,72	3,99	0,12	3,08	3,91	0,11	2,84	50,21	3,64	7,24
95	8,32	1,82	21,87	0,7213	0,0427	5,92	3,84	0,07	1,87	3,87	0,05	1,19	3,86	0,02	0,54	51,65	5,85	11,33
100	7,93	2,67	33,72	0,7156	0,0395	5,53	3,96	0,02	0,59	3,62	0,01	0,30	3,79	0,24	6,35	50,09	4,97	9,92

Procesado Vides filtrados por segmentación para baja intensidad																		
Concentración V/V	Umb (U.A)	±des	CV%	Área (Píxeles)	±des	CV%	Diámetro (Píxeles)	±des	CV%	nRegSel (#)	±des	CV%	SeMax (Píxeles)	±des	CV%	SeMin (Píxeles)	±des	CV%
0	0,13937	0,00273	1,96	2,25	0,22	9,82	1,61	0,07	4,32	22420	598	2,67	2,37	0,16	6,79	1,35	0,05	3,66
30	0,12760	0,00318	2,49	2,18	0,21	9,50	1,59	0,07	4,24	22895	319	1,39	2,30	0,16	6,75	1,33	0,05	3,43
35	0,12215	0,00495	4,05	2,22	0,29	13,05	1,60	0,09	5,76	22948	483	2,11	2,33	0,21	9,04	1,34	0,06	4,83
40	0,11471	0,00076	0,66	2,23	0,02	1,11	1,61	0,01	0,47	23300	103	0,44	2,34	0,02	0,74	1,34	0,01	0,40
45	0,12065	0,00379	3,14	2,05	0,26	12,80	1,55	0,09	5,59	22401	905	4,04	2,20	0,20	9,10	1,31	0,06	4,40
50	0,11475	0,00265	2,31	2,16	0,15	6,79	1,59	0,05	3,02	22516	468	2,08	2,28	0,11	4,81	1,33	0,03	2,42
55	0,12178	0,00251	2,06	2,01	0,11	5,22	1,54	0,04	2,32	22491	693	3,08	2,17	0,08	3,83	1,30	0,02	1,71
60	0,12188	0,00708	5,81	2,09	0,10	4,62	1,56	0,03	2,09	22323	976	4,37	2,23	0,07	3,26	1,31	0,02	1,61
65	0,11130	0,00070	0,63	2,26	0,01	0,61	1,62	0,00	0,27	22828	312	1,37	2,35	0,01	0,39	1,35	0,00	0,24
70	0,11043	0,00230	2,08	2,23	0,06	2,67	1,61	0,02	1,21	22156	336	1,52	2,32	0,04	1,89	1,34	0,01	0,98
75	0,10112	0,00073	0,72	2,43	0,00	0,19	1,67	0,00	0,10	22809	174	0,76	2,46	0,00	0,17	1,39	0,00	0,07
80	0,10609	0,00138	1,30	2,26	0,12	5,49	1,62	0,04	2,43	22488	253	1,12	2,34	0,09	3,73	1,35	0,03	2,04
85	0,09973	0,00075	0,75	2,31	0,09	3,87	1,64	0,03	1,66	23097	165	0,71	2,37	0,06	2,59	1,36	0,02	1,44
90	0,10191	0,00132	1,30	2,31	0,11	4,86	1,63	0,04	2,21	22731	464	2,04	2,37	0,08	3,38	1,36	0,03	1,84
95	0,10322	0,00347	3,36	2,23	0,18	8,01	1,61	0,06	3,60	22657	264	1,16	2,32	0,13	5,44	1,35	0,04	2,99
100	0,10051	0,00210	2,09	2,26	0,19	8,29	1,62	0,06	3,71	23152	311	1,34	2,33	0,13	5,71	1,35	0,04	3,10
Concentración V/V	Alfa (°)	±des	CV%	Exen (U.A)	±des	CV%	HFWHM (Píxeles)	±des	CV%	VFWHM (Píxeles)	±des	CV%	FWHMM (Píxeles)	±des	CV%	meanInt (U.A)	±des	CV%
0	14,89	0,31	2,05	0,4891	0,0291	5,94	2,15	0,11	5,16	2,02	0,01	0,25	2,09	0,09	4,22	40,71	0,94	2,30
30	16,81	0,39	2,31	0,4804	0,0312	6,49	1,96	0,05	2,33	2,17	0,05	2,12	2,07	0,15	7,21	37,04	0,81	2,17
35	17,15	0,34	1,98	0,4869	0,0399	8,20	1,94	0,03	1,44	2,17	0,07	3,32	2,06	0,16	7,96	35,61	1,23	3,45
40	16,80	0,20	1,20	0,4921	0,0030	0,61	1,98	0,02	0,77	2,16	0,04	1,65	2,07	0,13	6,31	33,70	0,02	0,07
45	16,23	0,30	1,87	0,4598	0,0418	9,08	2,02	0,06	3,06	2,14	0,06	2,66	2,08	0,09	4,19	23,15	19,96	86,20
50	16,58	0,22	1,31	0,4805	0,0219	4,55	2,04	0,04	1,84	2,20	0,05	2,30	2,12	0,12	5,54	33,11	0,43	1,31
55	16,68	0,42	2,49	0,4570	0,0190	4,16	2,01	0,07	3,30	2,19	0,05	2,47	2,10	0,13	6,23	23,37	20,15	86,19
60	15,04	0,71	4,71	0,4689	0,0172	3,66	2,21	0,14	6,23	2,09	0,02	0,96	2,15	0,08	3,76	34,90	1,50	4,30
65	16,15	0,19	1,20	0,4953	0,0015	0,31	2,07	0,03	1,62	2,13	0,02	0,77	2,10	0,04	2,13	32,50	0,05	0,15
70	17,16	0,10	0,57	0,4890	0,0090	1,85	2,03	0,04	1,90	2,34	0,04	1,76	2,18	0,22	9,96	31,92	0,66	2,07
75	15,01	0,15	1,00	0,5179	0,0009	0,17	2,16	0,04	1,74	2,05	0,01	0,25	2,11	0,08	3,60	29,32	0,06	0,20
80	16,09	0,13	0,83	0,4943	0,0163	3,30	2,08	0,01	0,68	2,18	0,02	0,78	2,13	0,07	3,24	30,90	0,51	1,64
85	15,41	0,07	0,44	0,5027	0,0098	1,95	2,11	0,02	1,14	2,09	0,01	0,62	2,10	0,02	0,86	29,07	0,10	0,33
90	16,28	0,25	1,53	0,5005	0,0154	3,07	2,10	0,03	1,42	2,27	0,07	2,96	2,18	0,12	5,34	29,17	0,52	1,77
95	16,17	0,24	1,47	0,4901	0,0253	5,16	2,07	0,04	2,00	2,20	0,03	1,39	2,13	0,09	4,38	29,61	1,18	3,97
100	15,13	0,17	1,12	0,4942	0,0251	5,07	2,13	0,02	0,78	2,09	0,01	0,31	2,11	0,03	1,42	29,30	0,49	1,67

Para el análisis granulométrico de los patrones de speckle, se sometieron los 144 videos obtenidos, 44 videos originales y 88 filtrados por segmentación (alta y baja intensidad). Se calcularon los parámetros: Área, diámetro equivalente, número de regiones, semieje mayor, semieje menor, ángulo, e intensidad media en la región. Se busca las posibles correlaciones entre las intensidades, concentración, umbral, y diámetro equivalente. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10.

Se realiza una comparación, con los resultados obtenidos para el diámetro, con la función de autocorrelación, para hacer una comparación entre los resultados obtenidos por dos métodos diferentes, ya que la selección del umbral afecta los parámetros geométricos del tamaño del grano, calculado por el método propuesto en este trabajo, esta dependencia puede ser apreciada en la Figura 43. Obteniéndose que la variación entre el umbral y los demás parámetros geométricos, se ajustan a un modelo lineal, para más detalles se puede ver el Anexo 1 (pág. 124), donde se muestra esta dependencia gráficamente.

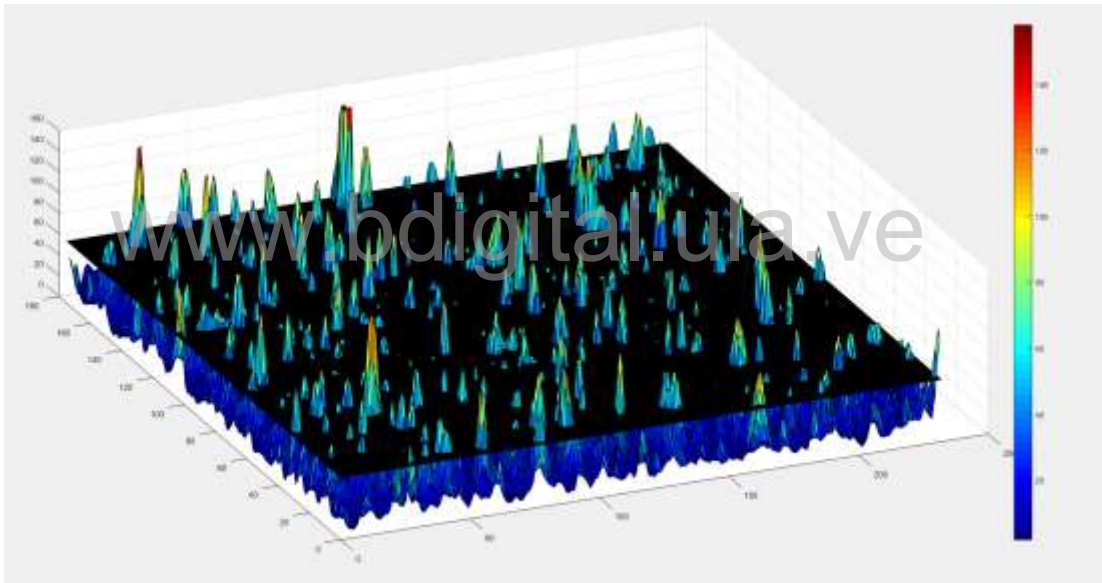


Figura 43 Relación parámetros geométricos granulometría con el umbral.

Relación entre el diámetro y el FWHM de la función de autocorrelación

Para comprobar el método propuesto, para la estimación del valor de grano medio del speckle, se comparan los resultados obtenidos con el tamaño del grano medio a partir del cálculo de la función de autocorrelación, empleando la rutina en Matlab® desarrollada por Lin (26). Se realizó el gráfico en el que se compara el ancho medio a mitad de la campana (FWHMM) y el diámetro para cada grupo de videos en cada concentración, resultados que se aprecian en la Tabla 10, y el gráfico se muestra en la Figura 44, donde se puede observar que hay una correlación lineal con un R^2 de 0,996 y un valor de pendiente cercano a uno, de $1,045 \pm 0,010$ respectivamente. Lo

que representa que los valores calculados del tamaño medio del grano con el diámetro, difieren en un 4,5%. Demostrando que, a pesar de las diversas fuentes de error, el valor estimado del diámetro, es equivalente a los valores calculados por la función de autocorrelación, validando el método de procesamiento planteado en el presente trabajo. Siendo este el resultado de mayor relevancia, debido a que si el tamaño del grano medio del speckle, calculado por el método propuesto, es cercano al obtenido por la función de autocorrelación, los otros parámetros medidos en la granulometría son válidos.

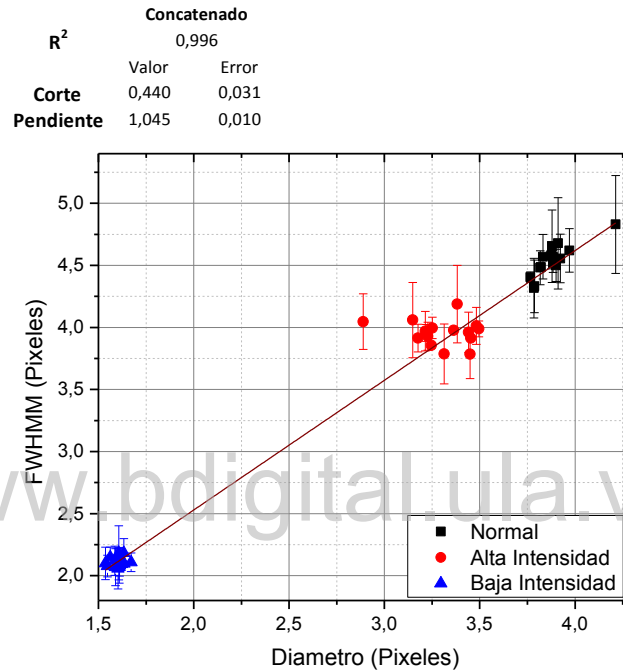


Figura 44 Variación del diámetro vs FWHMM.

Se presenta el mismo comportamiento realizando la comparación entre el diámetro, FWHM horizontal y vertical respectivamente, mostrados en la Figura 45 y Figura 46. Con muy buenos ajustes, para el HFWHM un R^2 de 0,989 y una pendiente de $1,077 \pm 0,016$ y VFWHM con un R^2 de 0,979 y una pendiente de $0,954 \pm 0,020$. Nótese que por el método propuesto se subestima el valor de HFWHM, mientras que se sobrestima el valor del VFWHM. Pero a pesar de que se parte del principio de que el grano es circular los valores obtenidos representan una buena estimación del tamaño medio del grano de speckle.

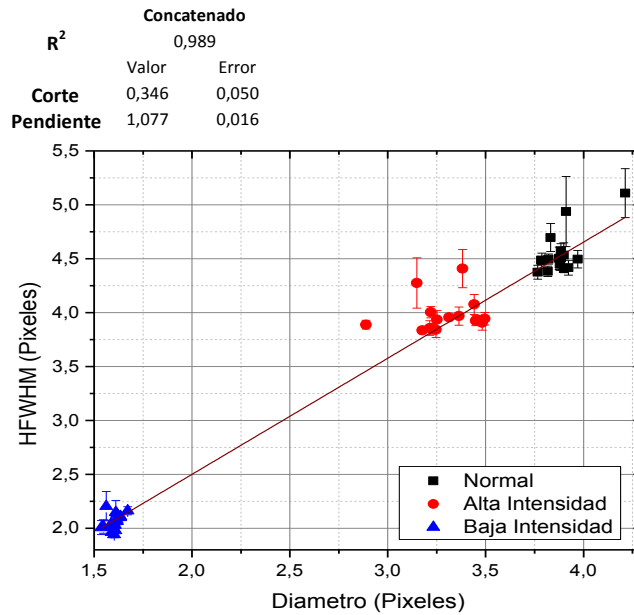


Figura 45 Variación del diámetro vs HFWHM.

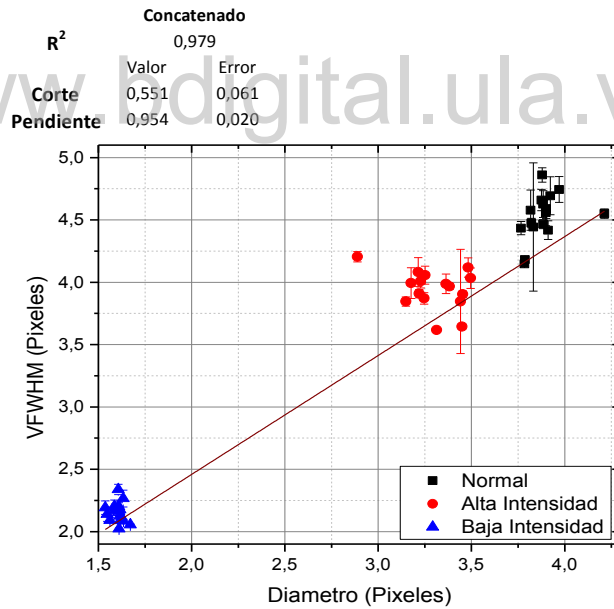


Figura 46 Variación del diámetro vs VFWHM.

Para finalizar se realiza la comparación entre el diámetro con el semieje mayor, menor y el ángulo. Obteniéndose una relación de proporcionalidad, con excelentes ajustes (ver Figura 47, Figura 48 y Figura 49), mostrándose una dependencia entre el diámetro y estas tres variables.

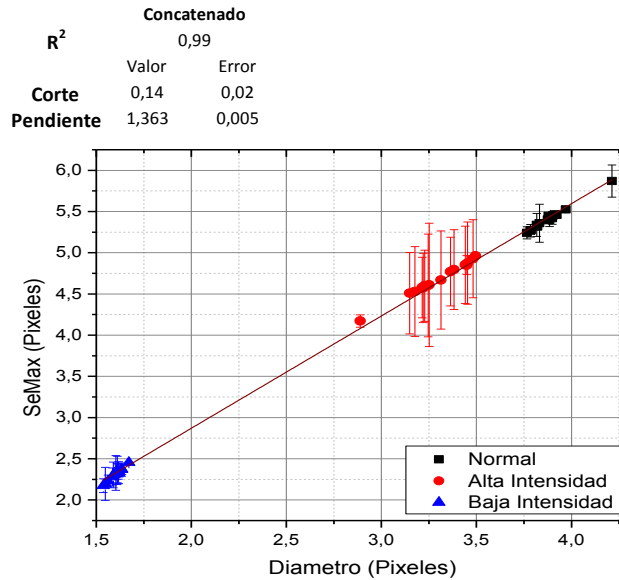


Figura 47 Variación del diámetro vs semieje mayor.

www.bdigital.ula.ve

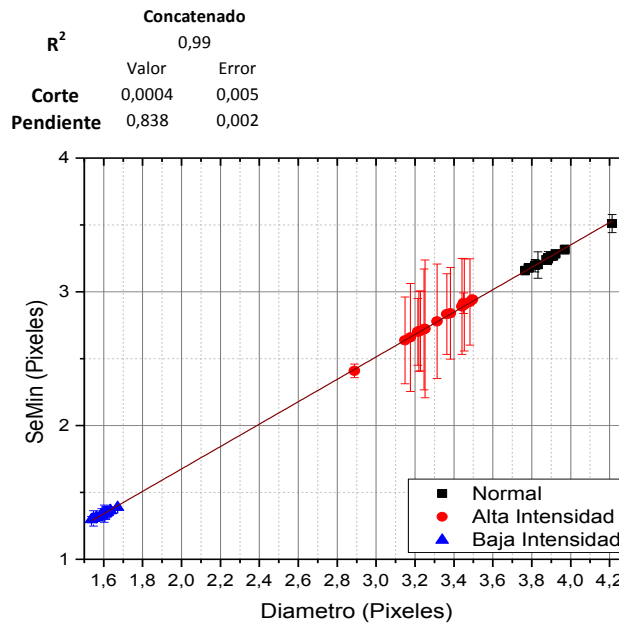


Figura 48 Variación del diámetro vs semieje menor.

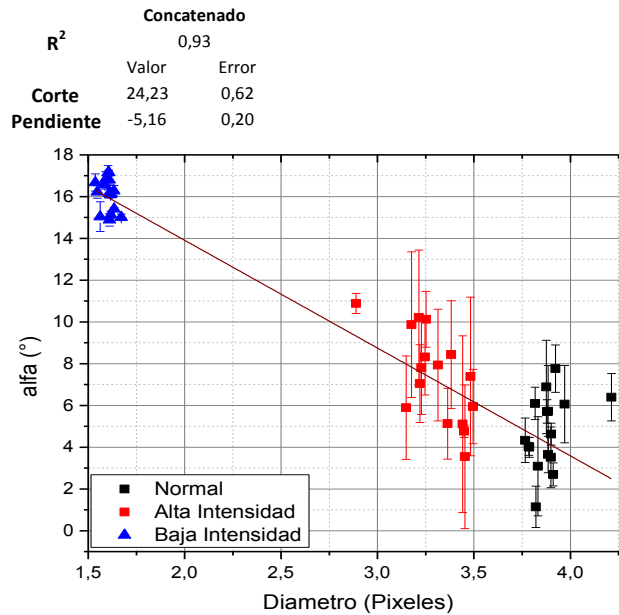


Figura 49 Variación del diámetro vs ángulo.

Variaciones en función de la concentración % V/V.

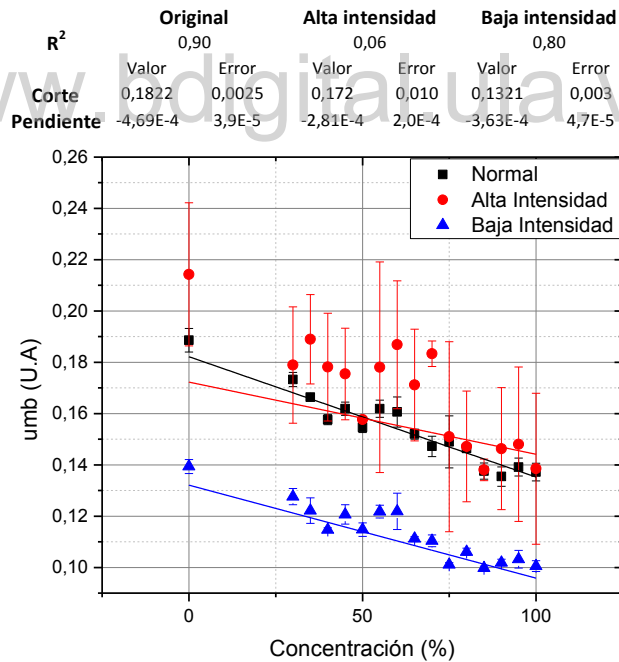


Figura 50 Variación de la concentración V/V vs umbral.

Una de las variables controladas en el experimento, es la concentración %V/V de la muestra utilizada, es de interés, realizar la comparación entre la concentración y los parámetros. Con los datos mostrados en la Tabla 10, se obtiene la variación de la concentración vs el umbral empleado (ver Figura 50), donde se puede observar que

los valores para el ajuste para el filtrado por segmentación, tanto para alta y baja intensidad empeoran considerablemente el ajuste, pasando de un valor del R^2 de 0,90 para los video originales a 0,06 para los de alta intensidad, los cuales poseen una dispersión considerable mayor que los obtenidos con los videos originales. Mejorando con 0,80 para baja intensidad, esto es debido a que para los videos de alta intensidad los valores medios de la intensidad son muy parecidos, ya que son cercanos al fondo.

Cuando se analiza la variación entre la concentración vs diámetro (ver Figura 51), se obtiene para las imágenes originales sin filtrado una respuesta de tipo lineal, con un R^2 de 0,77. Siendo este uno de los parámetros de mayor relevancia, ya que se calcula entonces un diámetro $\leq \delta_x$, es decir, el diámetro calculado por la metodología planteada en este trabajo es menor o igual al valor del tamaño promedio del grano del patrón de speckle. Otro parámetro relacionado con la geometría del grano medio de speckle, son Los resultados obtenidos entre la variación de la concentración y el diámetro son semejantes a las variaciones del área, HFWHM, VFWHM y FWHMM, mostrados en las Figura 52, Figura 53, Figura 54 y Figura 55. Ajustándose al modelo lineal las variaciones del área, VFWHM y FWHMM, a excepción del HFWHM que puede ser considerado como un valor constante, con un CV% máximo 4,43%, como se muestra en la Figura 55.

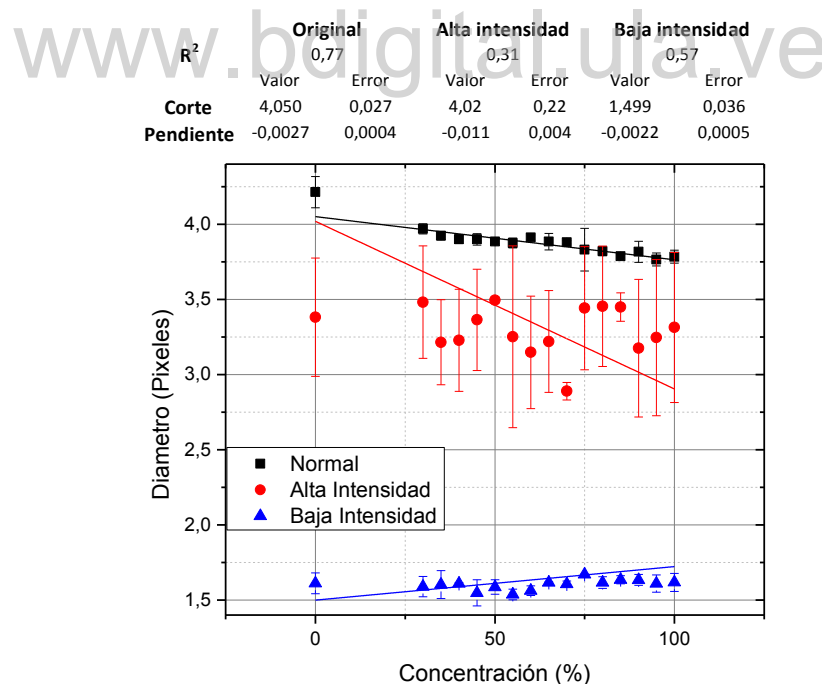


Figura 51 Variación de la concentración V/V vs diámetro.

	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
R^2	0,74		0,44		0,57	
Corte	14,40	0,20	14,44	1,16	1,87	0,12
Pendiente	-0,019	0,003	-0,077	0,022	-0,0072	0,0016

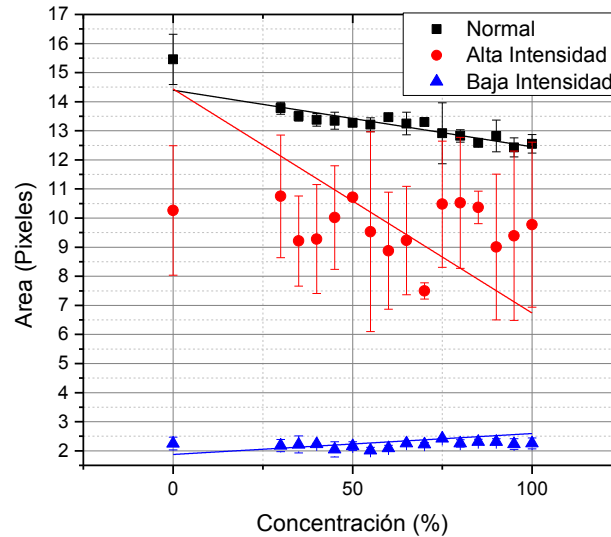


Figura 52 Variación de la concentración V/V vs área.

www.bdigital.ula.ve

	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
R^2	-0,07		-0,07		0,78	
Corte	4,47	0,06	3,92	0,07	1,89	0,02
Pendiente	-0,00002	0,00079	-0,0001	0,0008	0,0024	0,0003

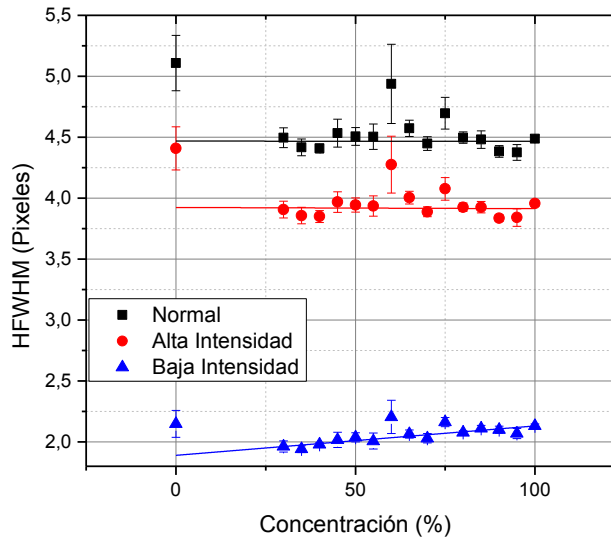


Figura 53 Variación de la concentración V/V vs HFWHM.

	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
R^2	0,59		0,52		0,78	
Corte	4,74	0,11	4,10	0,09	1,89	0,02
Pendiente	-0,006	0,001	-0,004	0,001	0,0024	0,0003

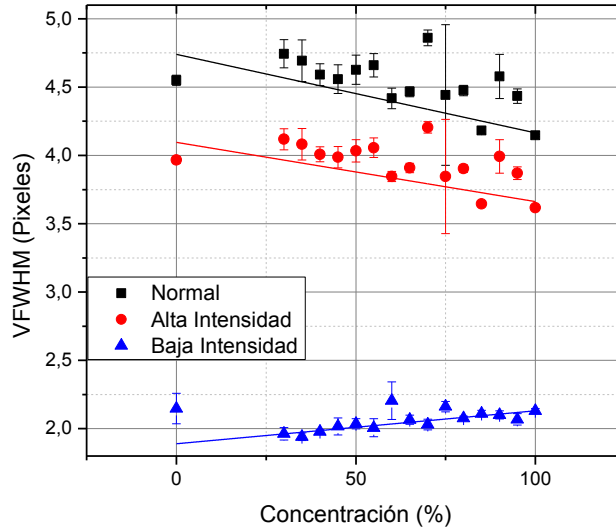


Figura 54 Variación de la concentración V/V vs VFWHM.

www.bdigital.ula.ve

	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
R^2	0,77		0,90		0,03	
Corte	4,65	0,02	4,08	0,01	2,08	0,02
Pendiente	-0,0021	0,0003	-0,0022	0,0002	0,0003	0,0002

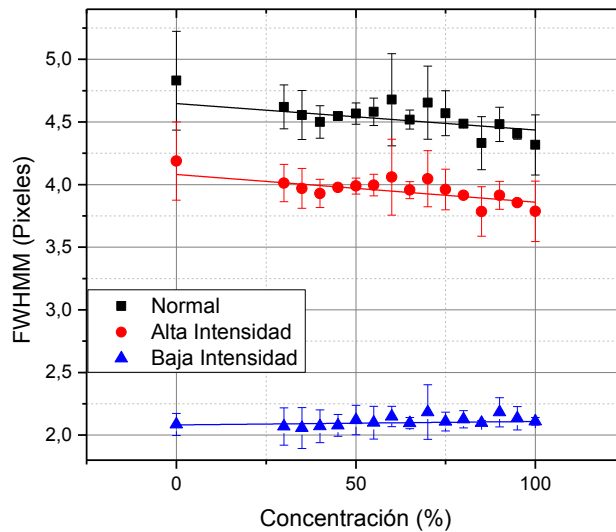


Figura 55 Variación de la concentración V/V vs FWHM.

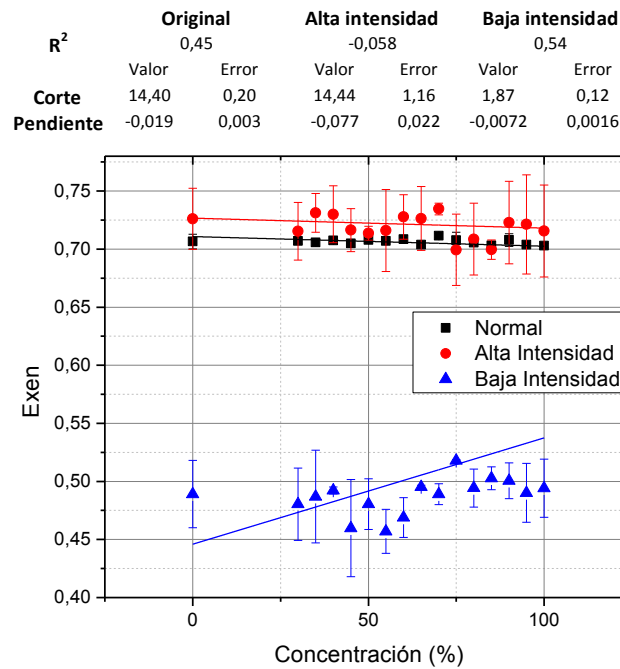


Figura 56 Variación de la concentración V/V vs la excentricidad.

Para estimar cual es la forma del grano de speckle, se muestra las variaciones de la excentricidad, siendo un indicador de la elipicidad del grano, ya que los valores obtenidos, se encuentran en el intervalo $0 \leq Exen < 1$, si los valores son más cercanos a 1 indica que el grano es más elíptico, en cambio con valores próximos a 0 son más circulares. La variación de la concentración vs la excentricidad se observa en la Figura 56. Las variaciones de la excentricidad no presentan un buen ajuste al modelo lineal, pero si se considera como un valor constante, las variaciones en el coeficiente de variación no son superiores al 3,20% (ver Tabla 11), siendo el menor CV% el obtenido en los videos originales de 0,32%. Donde se puede observar que para los videos de baja intensidad los granos son más elípticos, y los de alta intensidad más circulares.

Tabla 11 Variación de la excentricidad en función del tipo de procesamiento.

Procesamiento	Promedio	\pm Des	CV%
Normal	0,7063	0,0023	0,32
Alta Intensidad	0,719	0,011	1,46
Baja Intensidad	0,487	0,016	3,20

El valor de la excentricidad, está relacionado con los semiejes mayores y menores de la elipse, por lo que las variaciones de estos parámetros con la concentración son de interés. Obteniéndose un buen ajuste al modelo lineal planteado solamente para el procesamiento de las imágenes sin el filtrado por segmentación (ver Figura 57 y

Figura 58). Siendo siempre mayor el valor obtenido en el semieje mayor respecto al valor del semieje menor.

	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
R²	0,78		0,37		0,52	
Corte	5,65	0,04	5,73	0,25	2,12	0,08
Pendiente	-0,0041	0,006	-0,015	0,005	0,004	0,001

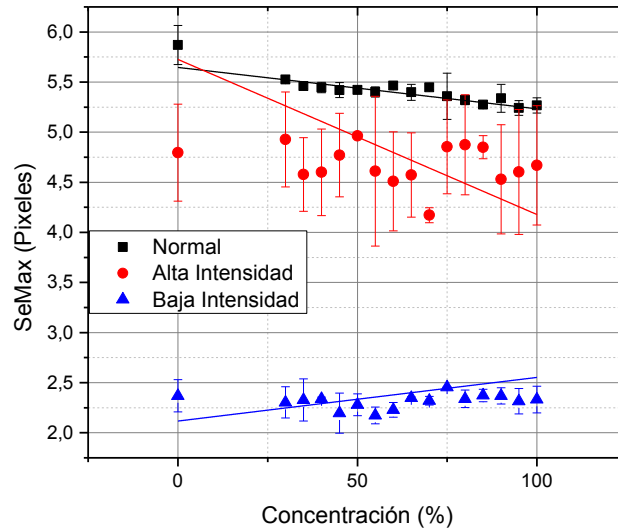


Figura 57 Variación de la concentración V/V vs Semieje mayor.

	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
R²	0,78		0,23		0,59	
Corte	3,359	0,017	3,32	0,21	1,265	0,025
Pendiente	-0,0020	0,003	-0,009	0,004	0,0016	0,0003

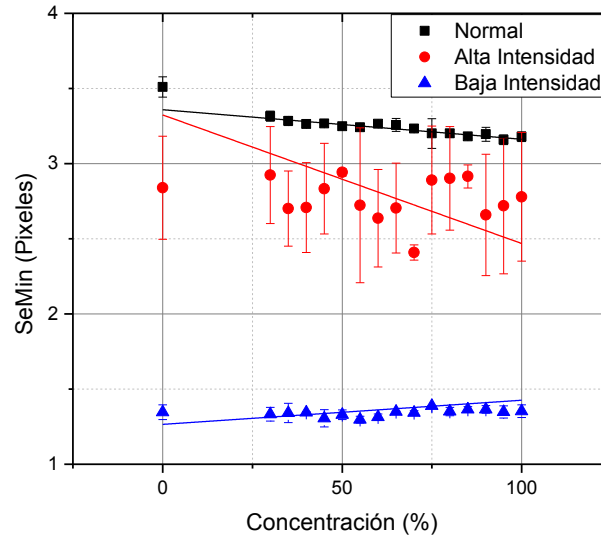


Figura 58 Variación de la concentración V/V vs Semieje menor.

El ángulo formado entre el semieje mayor y el menor no se ajustan al modelo lineal propuesto, obteniéndose un ajuste poco favorable (ver Figura 59), observándose que hay un incremento del mismo, en función del procesamiento que se le aplicó el filtrado por segmentación. Este proceso debido al fenómeno de speckle debería ser aleatorio, se puede observar una tendencia a disminuir el valor del ángulo a medida que aumenta la concentración, pero el ajuste no es concluyente.

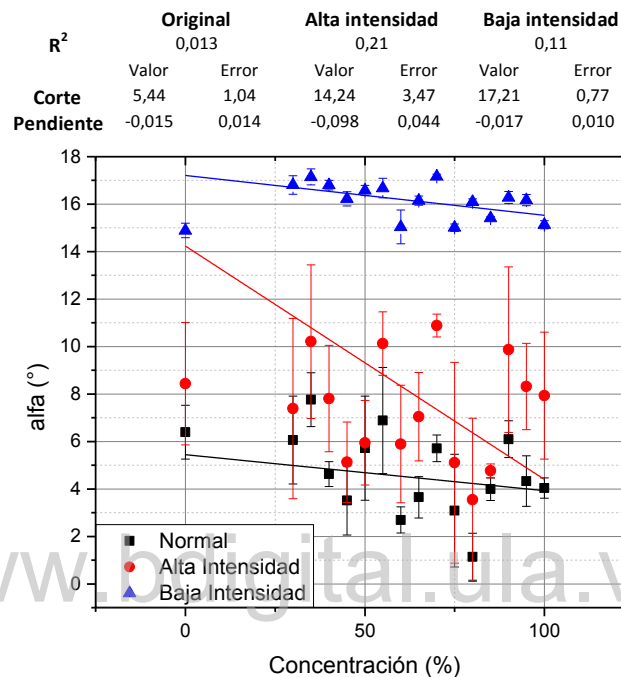


Figura 59 Variación de la concentración V/V vs ángulo alfa.

Otro punto de interés es el número de regiones seleccionadas o motas presentes en las imágenes, al igual que los resultados anteriores se realiza un ajuste lineal (ver Figura 60). Observamos que a medida que aumenta la concentración, aumenta el número de motas, y se obtiene una mejora en el ajuste en el caso de los videos de alta intensidad, disminuyendo la dispersión (ver Tabla 10), con el mejor R^2 obtenido, con un valor de 0,97. A medida que aumenta la concentración, hay más partículas de la muestra suspendidas en el agua, lo que se refleja con una mayor variación en el patrón de interferencia, debido a esto aumenta el número de motas presentes en los videos. El peor ajuste obtenido es para el caso de los videos de baja intensidad, con un R^2 de 0,11. Hay que notar que en los patrones de interferencia de baja intensidad aumenta considerablemente el número de motas presentes, esto se debe a que la relación señal ruido presente en la imagen es menor, por lo que, al momento de realizar el cálculo del umbral, se pueden obtener un número mayor de motas que para los otros procesamientos son descartados y considerados como fondo.

R ²	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
Corte	5179	86	5033	23	23342	223
Pendiente	8,72	0,93	6,91	0,30	-5,8	3,4

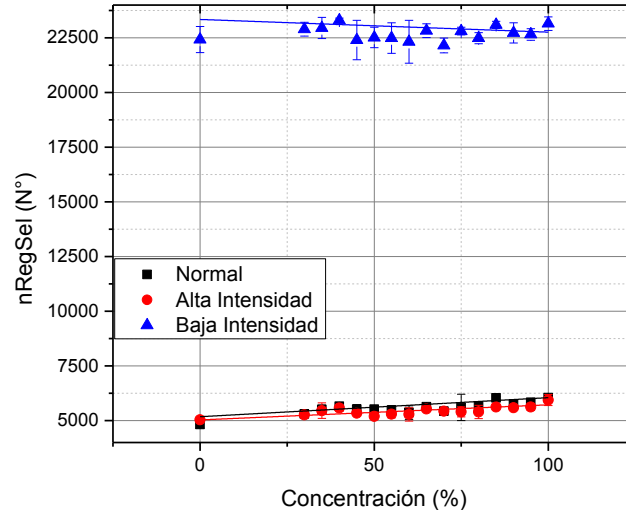


Figura 60 Variación de la concentración V/V vs número de motas.

Los parámetros determinados tienen una fuerte relación con el valor del umbral empleado, como se puede observar en la superficie de un segmento de un fotograma (ver Figura 61), donde se muestra un fragmento de un fotograma y como queda dividida la imagen en función del valor del umbral. A medida que el umbral aumenta el número de objetos disminuye y también lo hacen sus áreas. Considerando que en el patrón de speckle el área promedio del grano depende del área total sobre el umbral y el número total de motas $\bar{A} = A_{total} / \bar{N}$ (26), como el valor de \bar{A} y \bar{N} pueden ser obtenidos por la granulometría, es de interés encontrar el valor del área total sobre el umbral y ver su variación en función de la concentración.

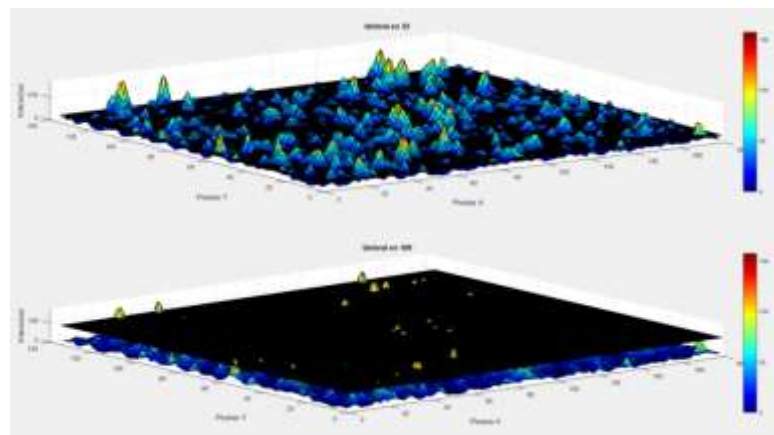


Figura 61 Superficie de una sección de un fotograma, donde se muestra cómo cambia la granulometría en función de la variación del umbral.

Se puede obtener el valor del producto entre el área y el número de motas encontradas, mostrado en la Tabla 12. Al realizar el grafico de estos datos (ver Figura 63), se puede observar que no se obtiene un buen ajuste, pero estos valores tienen a ser constantes, es decir no dependen de la concentración, el CV% máximo determinado es de 8,71% para los videos de alta intensidad, pero el menor CV% es para los videos originales con un 1,82, lo que sugiere que este es un parámetro que depende de las características propias de la muestra. A medida que el número de motas aumenta con la concentración el área disminuye, compensándose el producto de las mismas (ver Figura 62).

Tabla 12. Variación de la concentración vs el producto área número de motas.

Concentración V/V	Producto Área número de motas		
	Normal	Alta intensidad	Baja intensidad
0	74513	51644	50469
30	73085	56581	49907
35	74335	50272	50938
40	75723	51739	52057
45	73690	53467	45960
50	73344	55593	48715
55	72324	50446	45297
60	72345	46930	46676
65	74576	51103	51489
70	72251	40691	49332
75	72365	56570	55323
80	72673	56813	50728
85	75952	58316	53370
90	73775	50307	52452
95	72469	52836	50597
100	75989	58073	52247
Promedio	73713	52586	50347
±des	1340	4582	2694
CV%	1,82	8,71	5,35

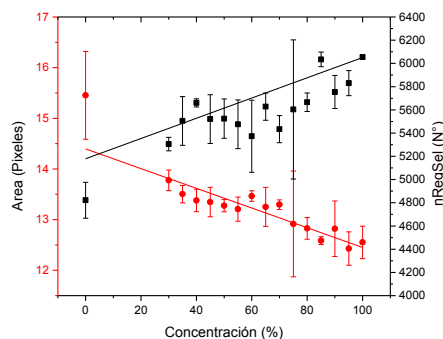


Figura 62 Variación de la concentración vs área y numero de motas.

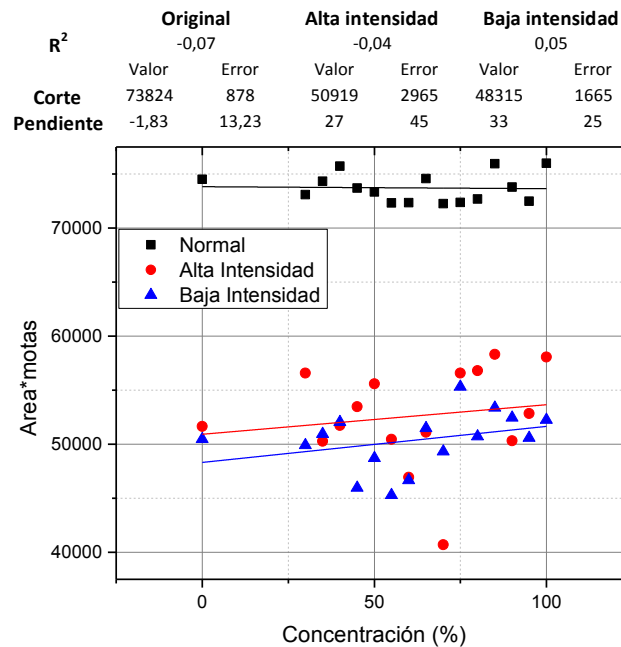


Figura 63 Variación de la concentración vs el producto área número de motas.

Para finalizar las variaciones en función de la concentración nos queda relacionar la intensidad media medida en la imagen original, encontrándose una excelente correlación lineal (ver Figura 64), siendo el mejor ajuste el calculado para las imágenes sin filtrado por segmentación, con un R^2 de 0,95 respectivamente.

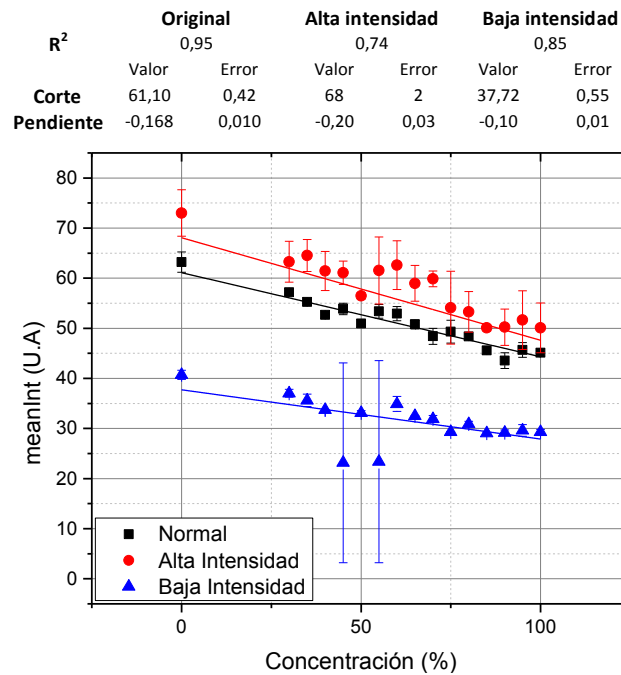


Figura 64 Variación de la concentración V/V vs intensidad media en la imagen.

La intensidad media medida directamente en la imagen original, para cada una de las motas poseer una correlación con el valor del umbral empleado (ver Figura 65), a medida que la intensidad aumenta proporcionalmente lo hace el umbral, obteniéndose un R^2 de 0,98.

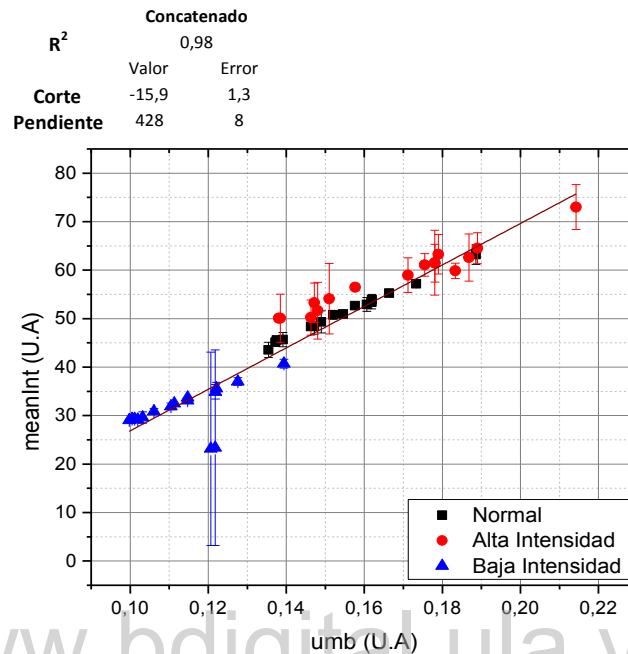


Figura 65 Variación del umbral vs intensidad media en la mota.

Relación Granulometría e intensidad por diferencias temporales

Otro punto de interés era ver si hay una correlación entre la intensidad calculada por el método de las diferencias temporales y la granulometría, pero no se obtuvo una buena correlación entre la intensidad y el diámetro (ver Figura 66), sin poder encontrar una correlación entre los valores calculados por ambos métodos. Con valores son reportados en la intensidad (Tabla 6) y diámetro (Tabla 10).

Finalmente se realiza una comparación entre la intensidad por diferencias temporales e intensidad media en la mota, ajustándose a un polinomio de grado 2 (ver Figura 67), siendo este uno de los mejores ajuste obtenidos, con la finalidad de relacionar variables granulométricos, con las variaciones de intensidad. No se encuentra una correlación evidente entre los métodos de procesamiento, ambos tienen sus ventajas y desventajas, el análisis por diferencias temporales requiere menor tiempo de computo, contrario al análisis granulométrico, que permite caracterizar la geometría de las motas, realizando las mediciones directamente sobre las imágenes adquirida de speckle dinámico.

R^2	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
Corte	3,16	0,41	0	3	2,31	0,05
Pendiente	0,002	0,0001	0,0009	0,0008	-0,0003	0,0001

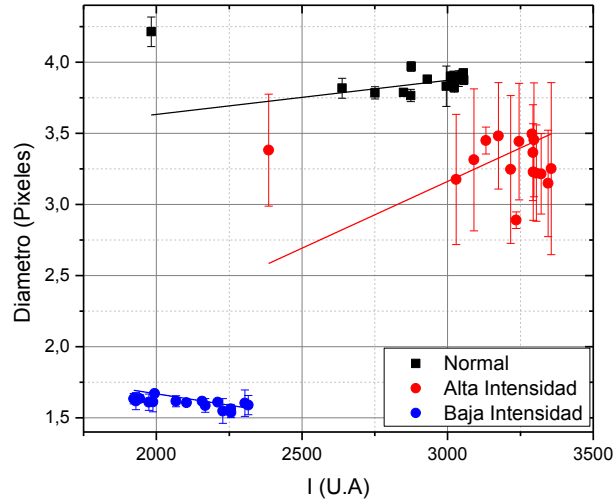


Figura 66 Variación de la Intensidad por diferencias temporales vs diámetro.

$Y=B1X+B2X^2$

R^2	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
C	373	114	751	130	121	70
B1	-0,25	0,08	-0,48	0,09	-0,10	0,07
B1	0,000049	0,000015	0,00081	0,00014	0,000030	0,000016

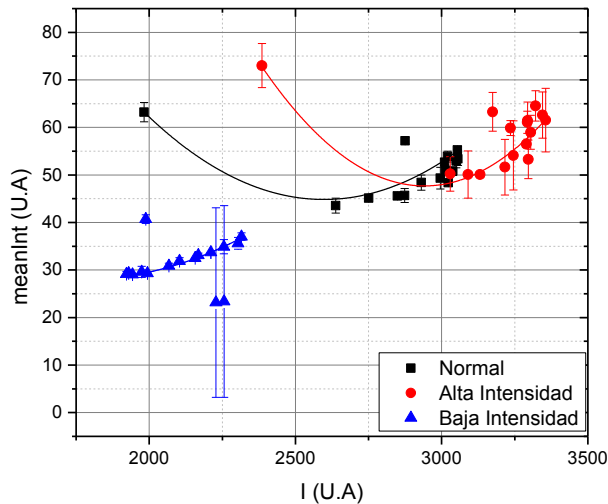


Figura 67 Variación de la Intensidad por diferencias temporales vs intensidad media en la mota

CAPÍTULO 5

Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Se diseñó con éxito, un conjunto de herramientas de análisis en Matlab®, para estudios de speckle dinámico, que permite realizar un filtrado de las imágenes por segmentación, para su posterior procesamiento por el método de las diferencias temporales y granulométricas.

Se desarrolla con éxito, un nuevo método de procesamiento, que permite aplicar un filtrado por segmentación, a imágenes de speckle dinámico, permitiendo separarla en señales de alta y baja intensidad, mejorando la respuesta en una curva concentración intensidad, calculada por el método de las diferencias temporales, mejorando los ajustes, pasando de un R^2 (imagen original) de 0,64, a un R^2 de 0,90 (alta intensidad), mejorando así un 40% el ajuste, en comparación con el análisis convencional. Mejorando la señal a estudiar, permitiendo observar pequeñas variaciones, en muestras de material biológico, con muy bajas concentraciones.

Se obtiene una buena respuesta en entre las variaciones de la concentración y la señal de baja intensidad, a pesar de que la relación señal ruido es muy baja, también mejora el ajuste obteniendo un R^2 de 0,75. Por lo tanto el procesamiento por segmentación mejora significativamente los resultados obtenidos en los análisis de intensidad.

No hay métodos analíticos, que permitan estimar de manera individual, el tamaño del grano de speckle, se desarrolla y compara, un nuevo método para la estimación del tamaño medio del grano de speckle, a través del desarrollo de un programa en Matlab®, que permite realizar la estadística, de los tamaños del grano de speckle, en las imágenes directamente, siendo comparado con los valores obtenidos por medio del cálculo de la función de autocorrelación, obteniéndose una proporcionalidad entre el diámetro equivalente y el ancho medio a mitad de la campana, con un R^2 de 0,996 y un valor de pendiente cercano a uno, de $1,045 \pm 0,010$ respectivamente. Diferenciando estos métodos en un 4,5% respectivamente. Demostrando que, a pesar de las diversas fuentes de error, el valor estimado del diámetro es equivalente a los valores calculados por la función de autocorrelación, validando el método de procesamiento planteado en el presente trabajo

El análisis granulométrico planteado, permite ampliar y conocer mejor las propiedades geométricas del grano de speckle, como es el caso del área, semieje mayor, semieje menor, excentricidad, ángulo, siendo el primer ensayo que se realizan mediciones de las propiedades morfológicas del grano directamente en la

imagen, es decir estudiando al grano individual. Sin embargo, uno de los parámetros del cual no se pudo obtener información concluyente fue el ángulo.

Los valores obtenidos para la excentricidad, se encuentran en el intervalo $0 \leq Exen < 1$, si los valores son más cercanos a cero indica que el grano es más elíptico, en cambio con valores próximos a 1 son más circulares, obteniendo una marcada diferencia entre los valores obtenidos entre los videos de alta y baja intensidad, pudiendo ser considerados como magnitudes independientes de la concentración, con un coeficiente de variación menor al 3,20%.

Se encuentra una clara relación que la concentración, es directamente proporcional al número de motas, obteniéndose un mejor ajuste en el caso de las imágenes de alta intensidad, es decir, un R^2 de 0,97; de pendiente positiva, observándose el leve aumento entre el número de motas, cuando se aumenta la concentración.

Se desarrolla un nuevo método, que permite estimar el valor de la intensidad media en la imagen de las motas de speckle dinámico. Obteniendo una buena correlación lineal entre esta magnitud y la concentración, con un R^2 entre 0,75 y 0,95, para los diferentes procesamientos realizados.

Se obtiene que el producto entre el área y el número de motas es constante, con un coeficiente de variación entre el 1,82% a 8,71%, medida que el número de motas aumenta con la concentración el área disminuye, compensándose el producto de las mismas. Siendo este un parámetro que puede estar relacionado con propiedades intrínsecas de la muestra en estudio.

Se desarrolla un método robusto, permite encontrar un valor óptimo para el umbral de binarización, siendo este el parámetro de mayor relevancia, para la segmentación de una imagen, hay una clara dependencia entre los parámetros granulométricos y el umbral seleccionado, con una variación del orden del 2%. Permite acortar significativamente los tiempos de cómputo necesarios para los cálculos granulométricos. No se puede obtener correlaciones entre los resultados obtenidos por el método de las diferencias temporales y la granulometría.

6.2 Recomendaciones

El montaje experimental empleado, permite hacer las mediciones con las otras longitudes de onda, por lo que se recomienda realizar un experimento en que se pueda variar las longitudes de onda (láser azul, verde y rojo) y realizar la comparación. Permite corroborar la relación entre el tamaño del grano, con la longitud de onda. Se puede también realizar las mediciones del tamaño medio del grano de speckle, realizando combinación de las diversas longitudes de onda disponibles, ya que son colineales.

Aprovechando la coincidencia entre las longitudes de ondas, disponibles en el montaje experimental, con los canales RGB, se puede realizar la comparación entre el procesado en escala de grises, con el análisis independiente por cada canal de la imagen RGB, para comparar como se modifica la capacidad de detectar cambios en el patrón de interferencia, esta forma de análisis lo permite la interfaz gráfica disponible en el Laboratorio de Óptica aplicada del IVIC.

Hacer una modificación de los códigos de análisis, para realizar la determinación del umbral, en función de tamaño del grano por la matriz de covarianza, y de esta manera compararlo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Como este es el primer estudio donde se mide individualmente el tamaño medio del grano de speckle, nos centramos en hacer la relación entre la matriz de covarianza y el diámetro equivalente, calculado con Matlab®, al hacer esa comparación se hizo directamente en pixeles. Para trabajos posteriores se debería hacer la relación que hay entre los elementos ópticos del sistema para hacer la transformación en la escala de pixeles a micrómetros.

Finalmente, para una misma muestra, realizar las mediciones por transmisión y reflexión y comparar los resultados obtenidos.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS

1. **Goodman, Joseph.** *Statistical properties of laser speckle patterns.* Stanford : s.n., 1963.
2. **Rigden, J. D. and Gordon, E. I.** *The granularity of scattered optical maser light.* 1962.
3. **Oliver, B. M.** *Sparkling spots and random diffraction.* 1963.
4. **Allen, L. and Jones, D. G. C.** *An analysis of the granularity of scattered optical maser.* 1963.
5. **Ratcliffe, J.** *Some aspects of diffraction theory and their application to the ionosphere.* 1956.
6. **Laue, Von.** *Die Beugungserscheinungen an vielen unregelmäßig verteilten.* 1914.
7. **Rayleigh, Lord.** *Note on the explanation of coronas, as given in Verdet's Lecons.* 1871.
8. **Goodman, Joseph.** *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications.* Washington : Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE), 2020. Second Edition.
9. **Gonzalo, Senda.** *Análisis de actividad es patrones de speckle dinámico.* Mar del Plata : s.n., 2009.
10. **Dainty, J. C.** *Laser speckle and related phenomena. (Topics in Applied Physics).* London : Springer-Verlag, 1975.
11. **Jr., Hector J. Rabal. Roberto A. Braga.** *Dynamic Laser speckle and applications.* New York : Taylor & Francis Group, LLC, 2009.
12. **Dainty, J. C.** *THE STATISTICS OF SPECKLE PATTERNS.* London : PROGRESS IN OPTICS XIV, 1976.
13. *Some fundamental properties of speckle.* **Goodman, Joseph.** 11, 1976, Journal of the Optical Society of America, Vol. 66, pp. 1145-1150.
14. **Goodman, Joseph.** Statistical Properties of Laser Speckle Patterns. [book auth.] J. C. Dainty. *laser speckle and related phenomena. (Topics in Applied Physics).* London : Springer-Verlag, 1975, Vol. 9, 2, pp. 9-74.
15. —. *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications.* Greenwood Village : Roberts & Company Publishers, 2006.

16. *Statistical Distribution of the Amplitude and Phase of a Multiply Scattered Field.* **Beckmann, Petr.** 3, 1961, JOURNAL OF RESEARCH of the National Bureau of Standards-D. Radio Propagation, Vol. 66D, pp. 231-240.
17. **Pearson, K.** *Mathematical Theory of Random Migration.* London : Draper's Company Research Memoirs, 1906.
18. *On the problem of random of random vibrations, and of random flights in one, two, or three dimensions.* **Rayleigh, J. W. Strutt (Lord.** 1919, Philosophical Magazine, Vol. 37, pp. 321-347.
19. **Schulman, Massimo Franceschetti. Jehoshua Bruck and Leonard J. A** *Random Walk Model of Wave Propagation.* s.l. : IEEE TRANSACTIONS ON ANTENNAS AND PROPAGATION, VOL. 52, 2004.
20. **Middleton, D.** *Introduction to Statistical Communication Theory.* New York : McGraw Hill Book Co., 1960. p. 362.
21. **W. B. Davenport, W. L. Root.** *Random Signals and Noise.* New York : McGraw Hill Book Co., 1958. p. 32.
22. *Autocorrelation Function and Power Spectral Density of Laser-Produced Speckle Patterns.* **Lester, Goldfischer.** 3, 1964, Journal of the optical society of america, Vol. 58, pp. 247-253.
23. *A macroscopic theory of interference and diffraction of light from finite sources, I. Fields with a narrow spectral range.* **Wolf, E.** 194, Proceedings of the Royal Society, Vol. 225, pp. 96-111.
24. **Goodman, Joseph.** *Introduction to Fourier Optics.* New York : McGraw-Hill Book Co., 1968. ch. 4.
25. **Bracewell, R. N.** *The Fourier Transform and its Applications.* New York : McGraw-Hill Book Company, 1999. p. ch. 8.
26. **Lin, H.** *Speckle mechanism in holographic optical coherence imaging.* s.l. : University of Missouri, PhD Thesis, 2009.
27. *Image Formation for Coherent Diffuse Objects: Statistical Properties.* **S. Lowenthal, H. H. Arsenault.** 11, 1970, Journal of the Optical Society of America, Vol. 60, pp. 1478-1483.
28. *The concept of degree of coherence and its application to optical problems.* **Zernike., F.** 1983, Physica, Vol. 5, pp. 785-795.
29. **Goodman, Joseph.** *Introduction to Fourier Optics. 3rd Edition.* Englewood : Roberts & Company, 2005.

30. *Numerical model for dynamic speckle: An approach using the movement of the scatterers.* **Rabal, H. J. et al.** 6, 2003, Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, Vol. 5, p. 381.
31. *The copula: A tool for simulating speckle dynamics.* **Duncan, D. D. and Kirkpatrick, S. J.** 1, 2008, Journal of the Optical Society of America A, Vol. 25, p. 231.
32. *Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle.* **A. Oulamara, G. Tribillon, y J. Duvernoy.** 2, 1989, Journal of Modern Optics, Vol. 36, pp. 165-179.
33. **Aizu, Y. and Asakura, T.** Bio-speckles. *Trends in Optics.* London: A. Consortini, 1996, pp. 27-49.
34. **Lucía Isabel Passoni, Gonzalo Hernán Senda, and Constancio Miguel Arizmendi.** Frequency Analysis. *Dynamic speckle and related phenomena.* New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2005, p. 142.
35. **Lucía Isabel Passoni, Gonzalo Hernán Senda, and Constancio Miguel Arizmendi.** Frequency Analysis. *Dynamic speckle and related phenomena.* New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2005, pp. 143-144.
36. —. Frequency Analysis. *Dynamic speckle and related phenomena.* New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2005, pp. 151-154.
37. **Rabal, Hector Jorge.** Activity Images, Generalized Differences, Fujii's, LASCA, and Related Methods. *Dynamic speckle and related phenomena.* New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2005, pp. 115-135.
38. *Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing.* **Fujii, H., Nohira, K., Yamamoto, Y., Ikawa, H. and Ohura, T.** 24, 1987, Applied Optics, Vol. 25, p. 5321.
39. *Display of local activity using dynamical speckle patterns.* **R. Arizaga, N. Cap, H. Rabal, y M. Trivi.** 2, 2002, Optical Engineering, Vol. 41, pp. 287-294.
40. *Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, fullfield technique for monitoring capillary blood flow.* **Webster, J. Briers y S.** 1996, Journal of Biomedical Optics, Vol. 1, p. 174.
41. *Some effects of target-induced scintillation on optical radar performance.* **Goodman, Joseph.** 11, 1965, Proceedings of the IEEE, Vol. 53, p. 1688.
42. *An algorithm to estimate vehicle speed using uncalibrated cameras.* **Dailey, Li &** Tokyo: s.n., 2002. JSAI International Conference on Intelligent Transportation Systems.

43. *An Improved Motion Detection Method for Real-Time Surveillance*. **Nan Lu, Jihong Wang, Q.H. Wu and Li Yang**. 1, 2008, IAENG International Journal of Computer Science, Vol. 35.
44. *Temporal difference method for processing dynamic speckle patterns*. **L. Martí-López, Humberto Cabrera, Ra Ramirez-Celorio & Re Gonzalez-Peña**. 24, 2010, Optics Communications, Vol. 283, pp. 4972-4977.
45. **Roberto A. Braga Jr., Giovanni F. Rabelo, Joao Bosco Barreto Filho, Flávio M. Borém, Joelma Pereira, Mikiya Muramatsu, and Inácio Maria Dal Fabbro**. Applications in Biological Samples. *Dynamic speckle and related phenomena*. New York : Taylor & Francis Group, LLC, 2005, pp. 182-217.
46. *Biological activity measurements on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle*. **Oulamara A, Tribillon G, Doubernoy J**. 2, 1986, Journal of Modern Optics, Vol. 36, pp. 165–79.
47. *Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens*. **Xu Z, Joenathan C, Khorana BM**. 5, 1995, Optical Engineering, Vol. 34, pp. 1487–1502.
48. *Point-wise and whole-field speckle intensity fluctuation measurements applied to botanical specimens*. **Zhao Y, Wang J, Wu X, Williams FW, Schmidt RJ**. 1997, Optics and Lasers in Engineering, Vol. 28, pp. 443-456.
49. *Bio-speckle assessment of bruising in fruits*. **Pajuelo M, Baldwin G, Rabal H, Cap N, Arizaga R, Trivi M**. 2003, Optics and Lasers in Engineering, Vol. 40, pp. 13–24.
50. *Temperature effect on apple biospeckle activity evaluated with different indices*. **Kurenda A, Adamiak A, Zdunek A**. 2012, Postharvest Biology and Technology, Vol. 67, pp. 118-123.
51. *Testes de Vigor: Importância e Utilização, in Vigor de sementes: conceitos e testes*. **Marcos Filho, J**. Londrina : s.n., 1999, ABRATES.
52. *Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique*. **Braga Jr. RA, Rabelo GF, Granato LR, Santos EF, Machado JC, Arizaga R, et al**. 2005, Biosystems Engineering, Vol. 91, pp. 465-469.
53. *Procesado de patrones de speckle mediante dos métodos para medir la desecación de semillas uchuva*. **Ingrid Inciarte, Luis Martí, Evelio Ramírez, Erick Hernandez, Angel Vioria y Fernando Otálora**. 9, 2012, INTERCIENCIA. Revista de Ciencia y Tecnología de las Américas, Vol. 37, pp. 644-650.
54. *Frequency response of biospeckle laser images of bean seeds contaminated by fungi*. **Rabelo GF, Enes AM, Braga Jr. RA, Dal Fabro IM**. 2011, Biosystems Engineering, Vol. 110, pp. 297–301.

55. **Henry, M. R. J. M. and Neves, J. P.,** *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal : Belo Horizonte, 1999.
56. **Ribeiro, K. M.** *Efeito da composição nas isotermas de sorção e características do biscoito de polvilho*. Lavras : Universidade Federal de Lavras, 2006.
57. **Silva, W. A.** *Elaboração e caracterização de biofilmes obtidos de diferentes fontes de amigo*. Lavras : MS degree. Universidade Federal de Lavras., 2005.
58. *Nuevo método para determinar el tiempo de licuefacción en semen fresco mediante Speckle dinámico*. **Leal, Carlos.** 22, 2020, Conocimiento Libre y Licenciamiento., Vol. 11, pp. 103– 116.
59. **Mohammad Ansari, Hilda C. Grassi , Humberto Cabrera, Ana Velásquez, and Efrén D. J. Andrades.** *Online fast Biospeckle monitoring of drug action in Trypanosoma cruzi parasites by motion history image*. London : Springer-Verlag, 2016.
60. **Hilda C. Grassi, Humberto Cabrera, Efrén D. J. Andrades, Evelio E. Ramírez-Miquet, Isabel Otero, Dania Rodríguez, Juan G. Darias.** *Digital imaging information technology for biospeckle activity assessment relative to bacteria and parasites*. London : Springer-Verlag, 2016.
61. **Mohammad Ansari, Humberto Cabrera, Hilda Grassi, Ana Velasquez, Efrén Andrades, A. Mujeeb.** Applications of biospeckle laser method for drug testing on parasites. *Advanced Studies in Experimental and Clinical Medicine Modern Trends and Latest*. New York : Taylor & Francis, 2021, pp. 167-180.
62. *Flow visualization by means of single-exposure speckle photography*. **Briers, A. Fercher and J.** 5, 1981, Optics Communications, Vol. 37, pp. 326-330.
63. *Clinical applications of laser speckle contrast imaging: a review*. 8, 2019, Journal of Biomedical Optics, Vol. 24.
64. *Alteration of microcirculation is a hallmark of very early systemic sclerosis patients: a laser speckle contrast analysis*. **al, A. Della Rossa et.** 2013, Clinical and Experimental Rheumatology, Vol. 31.
65. *Continuous monitoring of arthritis in animal models using optical imaging modalities*. **al., T. Son et.** 10, 2014, Biomedical Optics Express, Vol. 19, pp. 1083-3668.
66. *Endoscopic laser imaging of tissue perfusion: new instrumentation and technique*. **al., K. R. Forrester et.** 3, 2003, Lasers in Surgery and Medicine, Vol. 33, pp. 151 – 157.

67. *Blood flow dynamics after laser therapy of port wine stain birthmarks.* **al., Y. C. Huang et.** 8, 2009, *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 41, pp. 563 –571.
68. *Novel optical techniques for imaging microcirculation in the diabetic foot.* **al., O. A. Mennes et.** 12, 2018, *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 24, pp. 1304 –1316.
69. *Microcirculatory changes in venous disease.* **L. C. Huisman, C. den Bakker and C. H. A. Wittens.** 1, 2013, *Phlebology*, Vol. 28, pp. 73 –78.
70. *Prediction of venous wound healing with laser speckle imaging.* **al., T. M. van Vuuren et.** 10, 2017, *Phlebology*, Vol. 32, pp. 658 –664.
71. *Short-term follow-up of digital ulcers by laser speckle contrast analysis in systemic sclerosis patients.* **al., B. Ruaro et.** 2015, *Microvascular Research*, Vol. 101, pp. 82 –85.
72. *Use of laser speckle flowgraphy in ocular blood flow research.* **al., T. Sugiyama et.** 7, 2010, *Acta Ophthalmologica*, Vol. 87, pp. 723 –729.
73. *Assessment of flow dynamics in retinal and choroidal microcirculation.* **al., X. Wei et.** 5, 2018, *Survey of Ophthalmology*, Vol. 63, pp. 646 –664.
74. *Noncontact, two-dimensional measurement of retinal microcirculation using laser speckle phenomenon.* **Y. Tamaki et al.** 11, 1994, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 35, pp. 3825 –3834.
75. *Pulse-wave analysis of optic nerve head circulation is significantly correlated with brachial-ankle pulse-wave velocity, carotid intima-media thickness, and age.* **al., T. Shiba et.** 9, 2012, *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, Vol. 250, pp. 275 –1281.
76. *Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow in humans during neurosurgery: a pilot clinical study.* **al., A. B. Parthasarathy et.** 6, 2010, *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 15, p. 066030.
77. *Intraoperative monitoring of cerebral blood flow by laser speckle contrast analysis.* **N. Hecht et al.** 4, 2009, *Neurosurgical Focus*, Vol. 27, p. E11.
78. *Laser speckle contrast imaging for intraoperative assessment of liver microcirculation: a clinical pilot study.* **al., S. Eriksson et.** 2014, *Medical Devices*, Vol. 7, pp. 257 –261.
79. *Laser speckle contrast imaging identifies ischemic areas on gastric tube reconstructions following esophagectomy.* **al., D. M. J. Milstein et.** 25, 2016, *Medicine*, Vol. 95, p. e3875.

80. *Design and evaluation of a miniature laser speckle imaging device to assess gingival health.* **al., C. Regan et.** 10, 2016, Journal of Biomedical Optics, Vol. 21, p. 104002.
81. *etection of white spot lesions by segmenting laser speckle images using computer vision methods.* **al., L. G. Gavinho et.** 7, 2018, Lasers in Medical Science, Vol. 33, pp. 1565–1571.
82. *Application of dynamic speckle interferometry to the drying of coatings.* **Amalvy, J. I. et al.** 1, 2001, Progress in Organic Coatings, Vol. 42, p. 89.
83. *Applications Of Laser Speckle In Metallic Corrosion.* **Habib, K.** San Diego : s.n., 1989. Proceedings of SPIE.
84. *Speckle correlation used to study the oxidation process in real time.* **Muramatsu, M.** 3, 1994, Optics & Laser Technology, Vol. 26, p. 167.
85. *Strain/stress measurements using electronic speckle pattern interferometry.* **Tilo Pfeifer, Horst Konstantin Mischo, Andreas Ettemeyer, Zhiguo Wang, Ronny Wegner.** Boston : s.n., 1998. Photonics East.
86. *Residual stress measurements in steel pipes using DSPI and the holedrilling technique.* **al., Livia R. Lothhammer et.** 2017, International Journal of Pressure Vessels and Piping, Vol. 152, pp. 46–55.
87. **al., R. Rodríguez-Vera et.** *Algunas aplicaciones industriales de la interferometría electrónica de patrones de moteado.* Guanajuato : Centro de Investigación en Matemáticas.
88. *Experimental Analysis of Thermo-mechanical Behaviour of Electronic Components with Speckle Interferometry.* **Pappalettere, C. Casavola L. Lamberti V. Moramarco G. Pappalettera C.** 2013, Strain, Vol. 49, pp. 497-506.
89. *Mizukami, A. and Muramatsu, M., Correlação de speckle dinâmico produzido por espalhamento de luz por partículas num meio líquido.* **Mizukami, A. and Muramatsu, M.** Caxambu : s.n., 1997. XVIII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada.
90. *Dynamic laser speckles and their applications to velocity measurement of the diffuse object.* **Asakura, T. and Takai.** 1981, Journal of Applied Physics, Vol. 25, p. 179.
91. *Accuracy and resolution of a dynamic-speckle profilometer.* **Semenov, D. V., Nippolainen, E., and Kamshilin, A. A.** 2006, Journal of Applied Physics, Vol. 45, p. 411.
92. **F., Andrades.** *Diseño, elaboración y ejecución de programa para el procesamiento de imágenes de Biospeckle por el Método Matemático de las*

Diferencias Temporales. Mérida : Tesis de Maestría. Universidad de Los Andes, 2011.

93. **L., Garcías**. *Evaluación comparativa del ensayo de fármacos desenergizantes sobre Trypanosoma cruzi usando “biospeckle” y otras técnicas de bioensayo*. Mérida : Tesis de Maestría, 2011.

94. **L., Lobo**. *Estrategias para evaluar la actividad biológica de fármacos comerciales sobre Trypanosoma cruzi*. . Mérida : Tesis de Maestría. Universidad de Los Andes, 2011.

95. **O., Belandria**. *Evaluación comparativa de la quimiotaxis y el antibiograma con el método “biospeckle” sobre bacterias*. Mérida : Tesis de Maestría. Universidad de Los Andes, 2011.

96. **Díaz K., Gallegos K**. *Utilización del sistema dinámico “biospeckle” para medir el efecto de ciprofloxacina sobre Escherichia coli cepa 322 K-12*. . Mérida : Tesis de pregrado Universidad de Los Andes , 2013.

97. **A., Arrieche**. *Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de biospeckle a ensayos con Trypanosoma cruzi en viales de cultivo profundo*. Mérida : Tesis de pregrado. Universidad de Los Andes, 2013.

98. **Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd**. CNI Laser, optics & photonics. [Online] <http://www.cnilaser.com/>.

99. **Collins, Te Rand**. Through the Lens: Microscopes and Other Equipment. [Online] [Cited: enero 08, 2021.] <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmar16/trc-nikon.html>.

100. **l'Observatoire de Paris**. Cámara CCD : principio. [Online] UFE. <https://media4.obspm.fr/public/VAU/instrumentacion/instrumento/ccd/camara-ccd/APPRENDRE.html>.

101. **ThorLabs, INC.** THORLABS. [Online] <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=DCU223C>.

102. *Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities*. **Fernando Lopitz-Otsoa, Aitor Rementeria, Natalia Elguezabal & Javier Garaizar**. 2006, Revista Iberoamericana de Micología., Vol. 23, pp. 67-74.

103. **El correo del sol**. El correo del Sol, por el cambio global. [Online] [Cited: enero 07, 2021.] <https://elcorreodelsol.com/articulo/que-es-el-kefir>.

104. *Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary*. 2010, Karina Teixeira Magalhães-Guedes, Gilberto Vinícius de M Pereira, Disney Ribeiro Dias & Rosane Freitas Schwan, Vol. 26, pp. 1241–1250.

105. **THORLABS.** *ThorCam User Guide.* 2020.
106. **Thorlabs Scientific Imaging.** *DCx Camera Functional Description and SDK Manual.* 2018.
107. **Laorden Fiter, E.** *Descripción, comparación y ejemplos de uso de las funciones de la toolbox de procesamiento digital de imágenes de MATLAB.* Madrid : s.n., 2012.
108. *A Threshold Selection Method from Gray- Level Histograms.* **Otsu, N.** 1, 1979, Transactions on Systems, Man and Cybernetics, 9(1), 62-66. , Vol. 9, pp. 62-66.
109. *Uso de la granulometría para el estudio de patrones de speckles dinámicos.* **Adriana Mavilioa, Margarita Fernández, Marcelo Trivi, Héctor Rabal y Ricardo Arizaga.** 1, 2010, Revista Cubana de Física, Vol. 27, pp. 34-41.
110. **MathWorks.** Regionprops. [Online] 2020. [Cited: 04 22, 2021.] https://es.mathworks.com/help/images/ref/regionprops.html?s_tid=mwa_osa_a.

www.bdigital.ula.ve

Anexos

Anexo 1

	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
R²	0,82		0,72		0,94	
Corte	8,04	0,62	25,1	2,3	4,00	0,10
Pendiente	33,8	4,1	-92	15	-16	1

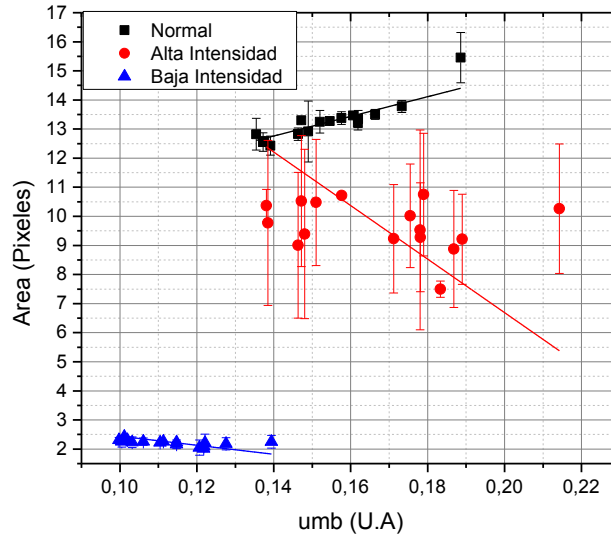


Figura 68. Variación del umbral vs área.

www.bdigital.ula.ve

	Original		Alta intensidad		Baja intensidad	
	Valor	Error	Valor	Error	Valor	Error
R²	0,83		0,66		0,94	
Corte	3,10	0,09	5,91	0,46	2,17	0,03
Pendiente	5,08	0,58	-16	3	-4,97	0,33

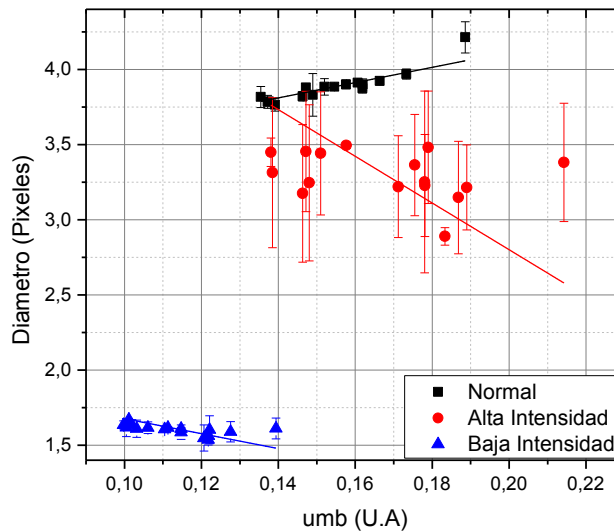


Figura 69. Variación del umbral vs diámetro.

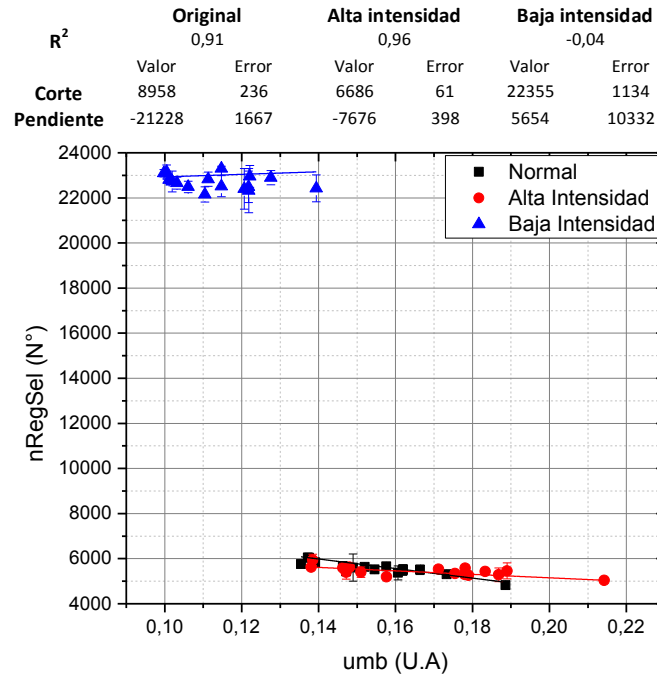


Figura 70. Variación del umbral vs número de motas.

www.bdigital.ula.ve

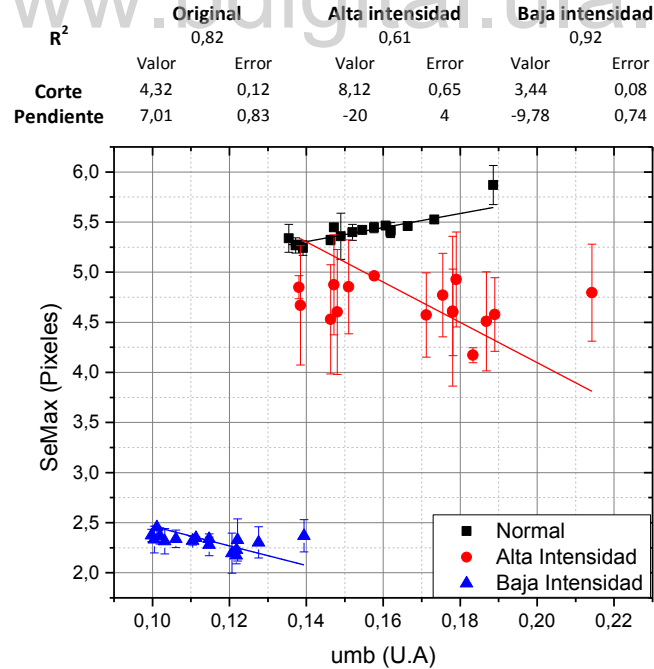


Figura 71. Variación del umbral vs semieje mayor.

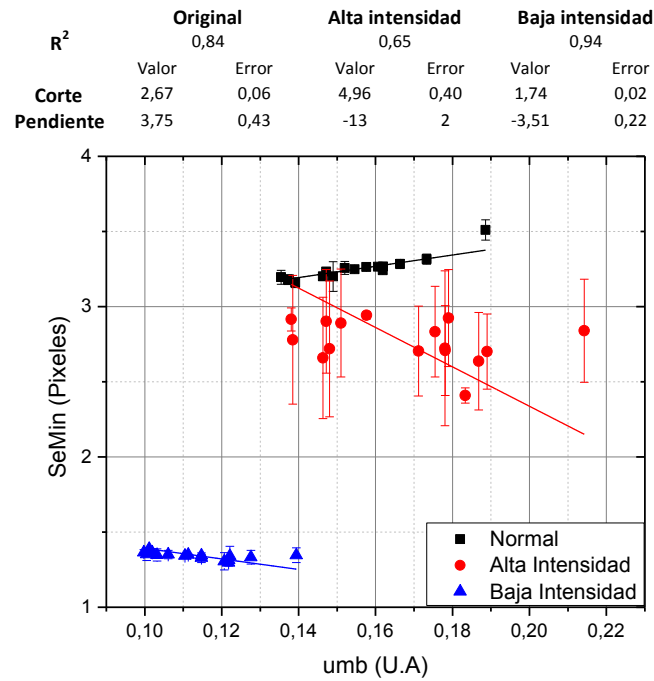


Figura 72. Variación del umbral vs semieje menor.

www.bdigital.ula.ve

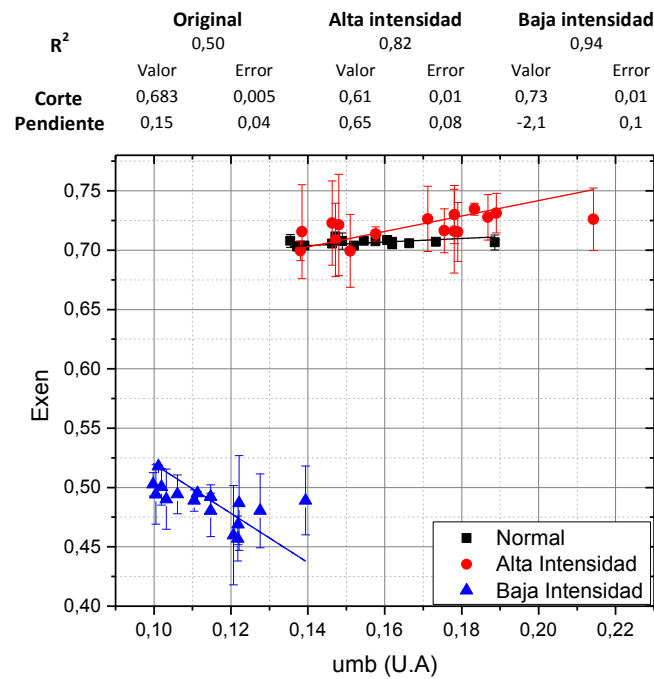


Figura 73. Variación del umbral vs excentricidad.