SISTEMA DE ADQUISICIÓN AUTOMÁTICA DE IMÁGENES PARA MICROSCOPIO ÓPTICO

HÉCTOR RENEÉ IBÁÑEZ GRANDAS
SAID DAVID PERTUZ ARROYO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES
BUCARAMANGA
2007

SISTEMA DE ADQUISICIÓN AUTOMÁTICA DE IMÁGENES PARA MICROSCOPIO ÓPTICO

HÉCTOR RENEÉ IBÁÑEZ GRANDAS
SAID DAVID PERTUZ ARROYO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Ingeniero Electrónico

Director:
Edwin Alberto Silva Cruz, MSc
Codirector:
César Antonio Duarte Gualdrón, MPE

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-MECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍAS ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y TELECOMUNICACIONES
BUCARAMANGA
2007

A mis padres mi abuelita y a mis hermanos, Jack Guiver entre ellos; a mis amigos, tías, tíos, primos y toda esa gente que quiero y me hace feliz.

Said David

Dedico éste trabajo a Dios, que me ha permitido lograr esta meta.

A mi mamá y mis hermanos.

A Jennifer, por sus palabras de aliento.

A mis primos en Bucaramanga

A todos mis amigos, que fueron una familia durante todos estos años.

Héctor Reneé

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por permitirnos llevar a cabo este proyecto.

Agradecemos a todas aquellas personas que de una u otra manera nos apoyaron al realizar este arduo y duro trabajo. A nuestras familias y amigos por su apoyo incondicional.

A nuestro director y codirector por sus orientaciones y oportunas sugerencias.

Al profesor Arturo Plata Gómez y al Dr. Jorge Humberto Echeverry por su amabilidad y disposición a ayudarnos. De igual forma al personal de los laboratorios de patología y óptica de la Universidad Industrial de Santander.

RESUMEN

TITULO:

SISTEMA DE ADQUISICIÓN AUTOMÁTICA DE IMÁGENES PARA MICROSCOPIO ÓPTICO*

AUTORES:

PERTUZ ARROYO, Said David; IBÁÑEZ GRANDAS, Héctor Reneé**

PALABRAS CLAVE: microscopio óptico, tratamiento digital de imágenes, medida de enfoque, autoenfoque, algoritmo de búsqueda

DESCRIPCIÓN

El presente documento contiene la descripción del desarrollo de un sistema que permite coordinar de manera autónoma desde PC los movimientos de la platina de un microcopio óptico en los ejes X, Y, y Z (enfoque), por medio de un conjunto de tres motores pasos a paso; el control se realiza empleando el puerto paralelo del computador. Acoplado al microscopio, se encuentra una cámara Web USB que envía las imágenes adquiridas al PC, para ser procesadas y determinar su grado relativo de enfoque por medio de técnicas basadas en tratamiento digital de imágenes. Éste sistema se elaboró pensando en desarrollar una herramienta que permita facilitar y agilizar el proceso de observación y adquisición de imágenes de microscopia óptica, en particular, imágenes de tejido humano.

Para la determinación de las imágenes mejor enfocadas, se realizó el estudio, implementación y evaluación de varios algoritmos, los cuales incluyen

---

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas; Escuela de Ingenierías Eléctrica, Electrónica y Telecomunicaciones; Director: Edwin Alberto Silva, MSc ; Codirector: Cesar Antonio Duarte, MPE

modificaciones y propuestas propias; el resultado de éste proceso fue la selección de los algoritmos de mejor desempeño. Posteriormente se desarrolló el algoritmo de búsqueda; este algoritmo es el que permite reducir el número de movimientos en el eje Z (enfoque) para obtener la imagen de mejor enfoque.

Como resultado final, después de algunos ajustes iniciales definidos por medio de una interfaz de usuario, el sistema inicia realizando los movimientos en el eje Z hasta lograr el punto de mejor enfoque. Posteriormente se realizan movimientos en los ejes X-Y para repetir el procedimiento en otras porciones de la muestra observada. El conjunto de imágenes adquiridas quedan a disposición del usuario para poder ser almacenadas de forma permanente.

ABSTRACT

TITLE:

AUTOMATIC IMAGE ADQUISITION SYSTEM FOR OPTIC MICROCOPY*

AUTHORS:

PERTUZ ARROYO, Said David; IBÁÑEZ GRANDAS, Héctor Reneé**

KEY WORDS: optic microscopy, digital image processing, focus measuring, autofocusing, searching algorithm

DECRIPTION

In this document, the development of a system that allows driving from PC the movements of a microscope stage in the X, Y and Z (focus) axis is described. The movement of the stage is driven via stepper motors, through the PC parallel port. A USB Web Cam is coupled to the microscope that sends acquired images to the PC for processing and measuring their relative degree of focus, based on digital image processing. This system was made, thinking in the development of a tool that facilitate and agility the observation and acquisition process of optic microscopic images, particularly, human tissue images.

For the determination of best focused images, the analysis, implementation and evaluation of several algorithms was made, which include modifications and own proposal algorithms; the selection of the best performance algorithms was the result of this process. Subsequently, the searching algorithm is developed; this algorithm allows reduce the movements in the Z axis (focus) to obtain the best focused image.

---

* Degree project

** Physics and Mechanics Engineering Faculty; School of Electrical, Electronic and Telecomunications Engineering ; Director: Edwin Alberto Silva, MSc ; Codirector: Cesar Antonio Duarte, MPE

As a final result, after the definition of some initial parameters by means of a user interface, the system starts doing the movement in the Z axis to focus the image and then, an X-Y movement takes place to repeat the focusing process in another portion of the sample. The acquired set of images is then available to the user for saving them permanently.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN **1**

1. MEDIDA DEL GRADO DE ENFOQUE **4**

1. 1. ALGORITMOS DE MEDIDA DE FOCO 5

1.1.1 DIFERENCIACIÓN DE IMÁGENES 5

1.1.1.1. Gradiente absoluto con umbral (TAG) y Suma de la Magnitud de la Diferencia (SMD). 6

1.1.1.2. Conteo del gradiente absoluto (CGA) 9

1.1.1.3. Promedio del gradiente absoluto (PGA). 10

1.1.1.4. Gradiente al cuadrado (SG). 11

1.1.2. TÉCNICAS DE SEGMENTACIÓN 12

1.1.2.1. Algoritmo Tenengrad (TEN) 13

1.1.2.2. Varianza Del Gradiente (VDG) 19

1.1.2.3. Algoritmo Laplacian (LAP) 23

1.1.3. TÉCNICAS EN BASE AL HISTOGRAMA 25

1.1.3.1. Algoritmo Entropía (ENT) 25

1.1.4. TÉCNICAS DEL CONTRASTE DE LA IMAGEN 25

1.1.4.1. Algoritmo Varianza (VAR) 26

1.1.5. FUNCIONES EN EL DOMINIO DE LA FRECUENCIA 26

1.1.5.1. Algoritmo de Transformada de Fourier (TFU) 26

1.2 COMPARACION DEL DESEMPEÑO DE LOS ALGORITMOS 27

1.2.1 CRITERIOS DE EVALUACIÓN 32

1.2.2 FUNCIÓN DE CALIFICACIÓN 36

1.2.3 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS. 36

1.2.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS 42

1.3 FUNCIÓN DE ESTIMACIÓN DE FOCO 47

1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FUNCIÓN 47

1.3.2 PRUEBAS A LA FUNCIÓN DE ESTIMACIÓN DE FOCO 50

1.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1 55

2. ALGORITMO DE BÚSQUEDA 58
2.1 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA 58
2.1.1 SENSIBILIDAD AL DESPLAZAMIENTO 59
2.1.2 COMPORTAMIENTO DE LA FUNCIÓN DE MEDIDA DEL GRADO DE ENFOQUE 60
2.2 ALGORITMO PROPUESTO 65
2.2.1 BÚSQUEDA DEL PUNTO DE ENFOQUE. 65
2.2.2 REENFOQUE 68
2.3 PRUEBAS AL ALGORITMO DE BÚSQUEDA 70
2.3.1 BÚSQUEDA DEL PUNTO DE ENFOQUE 70
2.3.2 REENFOQUE 72
2.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2 73

3. SISTEMA DE CONTROL DE POSICIÓN 75
3.1 SISTEMA MECÁNICO. 75
3.2 SISTEMA ELÉCTRICO 80
3.2.1 DISEÑO Y SELECCIÓN DE COMPONENTES 80
3.2.1.1. Requerimientos del sistema 80
3.2.1.2 Criterios de diseño 82
3.2.1.3. Diseño de la interfaz de control 83
3.2.1.4 Etapa de Aislamiento y acople. 84
3.2.1.5 Etapa de lógica digital. 84
3.2.1.6 Etapa de potencia. 87
3.2.2 CONSTRUCCIÓN DEL PROTOTIPO 87
3.2.2.1 PCB 87
3.3. INTERFAZ DE USUARIO 88
3.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO 3 89

4. CONCLUSIONES GENERALES 91

5. RECOMENDACIONES 93

REFERENCIAS..... 94

ANEXO A. OTROS ALGORITMOS DE MEDIDA DEL GRADO DE ENFOQUE 97

ANEXO B ASCOPE v1.0 GUÍA DEL USUARIO 99

B.1 INICIAR ADQUISICIÓN. 100

B.2 CONFIGURACIÓN DE NUEVA ADQUISICIÓN 104

B.3 ADQUISICIÓN AUTOMÁTICA 111

B.5. GUARDAR Y CARGAR IMÁGENES ADQUIRIDAS 115

B.6 INFORMACIÓN EN PANTALLA 115

ANEXO C. PLANOS Y FOTOGRAFIAS ILUSTRATIVAS..... 117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración del fenómeno de enfoque/desenfoque. 1
Figura 2. Diagrama del Sistema. 3
Figura 3. Pruebas comparativas del método TAG 8
Figura 4. Efectos del valor del umbral para el método TAG. 8
Figura 5. Resultados comparativos de los algoritmos CGA y TAG 9
Figura 6. Resultados de analizar imágenes con algoritmos TAG y SG 12
Figura 7. Resultados de aplicar TEN1 y TEN2 15
Figura 8. Calculo del gradiente de una imagen. 17
Figura 9. Resultados de aplicar algoritmos TENS, TEN16 y TEN8 19
Figura 10. Comparación de modelo estadístico datos reales 22
Figura 11. Efectos del umbral V sobre FMx 23
Figura 12. Comportamiento de FM en función de V para algoritmo LAP 24
Figura 13. Transformada de Fourier para una imagen 27
Figura 14. Imágenes de la base de datos... 31
Figura 15. Aplicación del algoritmo PGA a grupo de imágenes G1 33
Figura 16. Resultados de aplicar PGA y VDG a grupo de imágenes G1 34
Figura 17. Cálculo de S para la aplicación del algoritmo VDG 35
Figura 18. Aplicación de CGA, ENT, TF y F5V a grupo de imágenes G1 37
Figura 19. Resultados de aplicar PGA, LAP, SMD y SG a imágenes G1 37
Figura 20. Resultados de aplicar TAG, TEN8, VDG8 y VAR imágenes G1 ... 38
Figura 21. Efecto de la iluminación sobre desempeño de algoritmos 43
Figura 22. Acumulación de suciedad sobre muestras de microscopía. 43
Figura 23. Resultados de aplicar TAG al grupo G4. 45
Figura 24. Resultados normalizados de aplicar TEN8 a imágenes G4 45
Figura 25. Resultados de aplicar el algoritmo TEN a grupo de imágenes 46
Figura 26. Aplicación de grupos de algoritmos a imágenes G1 49
Figura 27. Selección de área de interés para estimación foco 50
Figura 28. Resultados de aplicar algoritmo TEN8 52
Figura 29. Aplicación de algoritmos en diferentes áreas de medición 54

Figura 30. Resultados normalizados variar el área de medición.. 54
Figura 31. Función de medida de enfoque para diferentes aumentos..... 61
Figura 32. Funciones de medida de enfoque para diferentes muestras..... 62
Figura 33. Características de la función de medida de enfoque..... 63
Figura 34. Factores que determinan la presencia de máximos locales 64
Figura 35. Efecto óptico causante de la aparición de máximos locales..... 64
Figura 36. Ubicación de puntos singulares en función de enfoque. 65
Figura 37. División de la función de medida de foco en regiones..... 66
Figura 38. Primeros puntos en el algoritmo de búsqueda 67
Figura 39. Diagrama de flujo de algoritmo de búsqueda de enfoque. 68
Figura 40. Algoritmo de reenfoque. Fuente: autores. 69
Figura 41. Diagrama de flujo de algoritmo de reenfoque..... 70
Figura 42. Disposición del acople en el tornillo micrométrico 76
Figura 43. Área de visión para el aumento de 3.5x.. 77
Figura 44. Acople realizado entre los motores y las perillas..... 78
Figura 45. Disposición de la platina y las perillas. 79
Figura 46. Disposición de los motores control X-Y 80
Figura 47. Pines del puerto paralelo. 82
Figura 48. Esquema de interfaz para control de motores 84
Figura 49. Lógica digital para el control de un motor. 87
Figura B1. Ventana de AScope v1. 101
Figura B2. Ventana de nueva adquisición 102
Figura B3. Ventana de Configuración general..... 104
Figura B4. Ventana de opciones de enfoque avanzado. 106
Figura B5. Ventana para definir el patrón de barrido. 108
Figura B6. Vista preliminar del área de barrido. 109
Figura B7. Ventana para realizar el proceso de adquisición. 112
Figura B8. Visualización de la adquisición 113
Figura B 9. Adquisición finalizada 114
Figura C1. Soporte mecánico de los motores..... 117
Figura C2. Pieza número uno. 118
Figura C3. Pieza número dos 118

Figura C4. Pieza número tres..... 119
Figura C5. Pieza número cuatro..... 119
Figura C6. Pieza número cinco. 120
Figura C7. Principales partes del microscopio a automatizar……121
Figura C8. Disposición del sistema mecánico para controlar ejes X-Y . ….....121
Figura C9. Disposición de sistema mecánico para micrométrico… ……....122
Figura C10. Vista general del control de movimiento de la platina…..…….122
Figura C11. Microscopio con las partes mecánicas adicionadas…...……....123

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Media y varianza para la variable aleatoria. 20
Tabla 2. Resumen de los algoritmos de medida de foco estudiados. 29
Tabla 3. Sumario de la base de datos de imágenes 30
Tabla 4. Ponderaciones de los criterios de evaluación 36
Tabla 5. Evaluación del desempeño de algoritmos de medida de foco 39
Tabla 6. Calificaciones obtenidas por los algoritmos. 40
Tabla 7. Porcentajes de éxito de los algoritmos..... 51
Tabla 8. Porcentajes de efectividad de algoritmos de mejor desempeño 55
Tabla 9. Sensibilidad del enfoque a desplazamientos de la platina 60
Tabla 10. Posiciones de mejor foco para los diferentes aumentos.. 62
Tabla 11. Máximos en la función de medida de enfoque. 65
Tabla 12. Tiempos de enfoque en los diferentes aumentos.. 71
Tabla 13. Efectividad del algoritmo de búsqueda. 72
Tabla 14. Efectividad del proceso de ajuste del enfoque 73
Tabla 15. Resolución obtenida en cada uno de los ejes. 80
Tabla 16. Velocidades de transmisión de datos al puerto paralelo 81
Tabla 17. Comparación entre microcontrolador y lógica discreta 86
Tabla 18. Alimentación y consumo de potencia de los motores. 87
Tabla B1. Requerimientos de la herramienta AScope 99
Tabla B2. Modos de selección para el área de medición 106
Tabla B3. Patrones de barrido predefinidos 110

INTRODUCCIÓN

Cuando se dispone de un lente o un conjunto de éstos (como es el caso de un microscopio óptico), para garantizar que el objeto a observar (muestra) se pueda ver con claridad, es necesario asegurarse de que la posición relativa entre los lentes y la muestra es la apropiada. Si la muestra está muy lejos o muy cerca del juego de lentes, es probable que el observador no pueda captar con claridad la imagen. La figura 3 ilustra el fenómeno de enfoque/desenfoque para un sistema como el de un microscopio óptico.

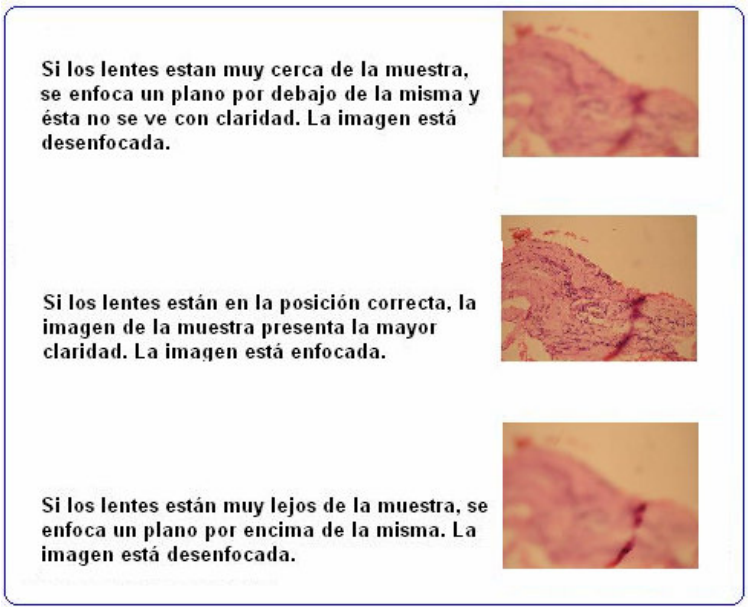


Figura 1. Ilustración del fenómeno de enfoque/desenfoque para imágenes observadas mediante un dispositivo óptico. **Fuente**: autores.

Para el diagnóstico de algunas enfermedades, se requiere observar al microscopio un conjunto de muestras. En este proceso de observación, el especialista debe examinar cuidadosamente cada muestra, para lo cual es necesario mover horizontalmente la platina del microscopio para hacer el barrido de la muestra completa (ya que en el objetivo del microscopio no se alcanza a observar la totalidad de la muestra). Dado que las muestras observadas al microscopio no quedan totalmente uniformes en el plano horizontal, entonces es necesario hacer pequeños reajustes al foco para volver

a enfocar la imagen cada vez que se hace el desplazamiento para realizar el barrido. Además, a medida que se utiliza un aumento mayor en el microscopio, el área de la muestra cubierta por el objetivo del mismo se va reduciendo, por lo cual el proceso de barrido de la totalidad de la muestra se hace más extenso y lleva más tiempo. En general, las características del procedimiento de observación de muestras hacen que el proceso sea lento y tedioso.

Por otro lado, a las dificultades técnicas anteriormente descritas se añade que después de un tiempo de trabajo determinado, el usuario se agota y el cansancio disminuye su rendimiento y puede afectar además su capacidad para detectar defectos en las muestras. Por lo anterior, se ve obligado a suspender el proceso o a ser reemplazado por otro especialista.

Las características del proceso anteriormente descrito, impiden el análisis de muchas muestras en una jornada, incrementa los costos y afectan la eficiencia al momento de realizar diagnósticos. El desarrollo de sistemas que permita facilitar y agilizar el proceso de observación de las imágenes del microscopio, como el desarrollado en este proyecto, se perfila entonces como una herramienta útil**.**

El sistema desarrollado que se describe en este documento, a partir de unos ajustes iniciales definidos por el usuario, inicia la adquisición por partes de la imagen de la muestra que se desea capturar. El microscopio lleva adaptada una cámara Web USB, que envía las imágenes captadas al computador. En el PC, las imágenes obtenidas son para poder obtener una medida relativa del grado de enfoque de la imagen. Con los resultados del procesamiento, el computador coordina, mediante un sistema de motores eléctricos paso a paso a través del puerto paralelo, el movimiento de la platina del microscopio para así lograr la posición de mejor enfoque. Una vez enfocada la imagen, ésta es almacenada de manera temporal y el sistema procede a realizar un desplazamiento de la platina en las direcciones X-Y para repetir el procedimiento anteriormente descrito con otra porción de la muestra.

Una vez finalizada la adquisición en el área indicada por el usuario, las imágenes quedan a disposición del usuario para ser almacenadas de forma permanente en el PC. El sistema de motores paso a paso se encuentra acoplado al microscopio de tal manera que hace posible el movimiento de la platina en la dirección de los ejes X e Y (para mover la muestra y hacer el barrido de la misma) y en la dirección del eje Z (para permitir el ajuste del foco). En la figura 2 se muestra un esquema general del sistema desarrollado.

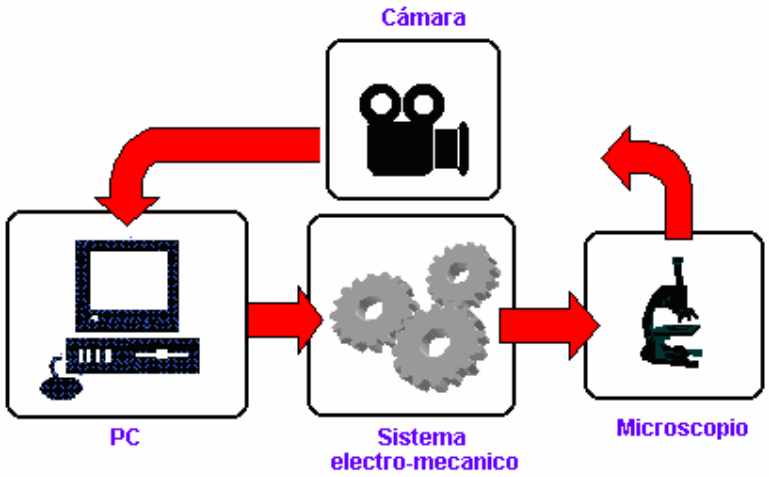


Figura 2. Diagrama del *Sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico*. **Fuente**: autores.

El primer capítulo del presente documento expone la evaluación y selección de algoritmos que permitan seleccionar la mejor enfocada de un conjunto de imágenes y el desarrollo final de una función de medida del grado de enfoque la cual va ser utilizada en el producto final. El segundo capítulo expone el desarrollo de un algoritmo que permita de manera rápida lograr el posicionamiento en el punto de mejor enfoque. El tercer capítulo presenta la interfaz eléctrica y mecánica que permitirá controlar los movimientos de la platina. Un cuarto capítulo se expone la manera en que se acoplaron los subsistemas desarrollados. Finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones.

1. MEDIDA DEL GRADO DE ENFOQUE

Un sistema de enfoque automático debe ser capaz realizar los movimientos necesarios de tal manera que sea posible seleccionar la posición de mejor foco. Para esta tarea, el desarrollo en software del enfoque automático debe poseer dos componentes fundamentales: la función de estimación del grado de enfoque de una imagen y el algoritmo de búsqueda de la posición de mejor foco. La función de estimación del grado de enfoque, que se expone en este capítulo, debe medir el grado relativo de foco de una imagen. Esto permite seleccionar la mejor enfocada entre un grupo de imágenes. Sobre funciones de estimación de foco, en el mundo se han llevado a cabo varios trabajos dirigidos al desarrollo y estudio de algoritmos de autoenfoque para microscopía [9,12,14,17,18] y otras aplicaciones [10,13], en los cuales se destaca la importancia de disponer de algoritmos rápidos y confiables para ser utilizados en sistemas de automatización. El otro componente software, el algoritmo de búsqueda, es descrito en el siguiente capítulo.

A continuación se expone el desarrollo de una función capaz de procesar una imagen digitalizada [1] para hacer una estimación de su grado relativo de enfoque. Al ser aplicada esta función a un conjunto de imágenes de la misma escena pero con distinto grado de enfoque, se calcula una figura de mérito que permite decidir cuál de las imágenes analizadas corresponde a la de mejor enfoque (medida del grado de enfoque). En la primera sección de este capítulo se describen algunas consideraciones sobre la implementación de algunos los algoritmos preliminares que permiten medir el grado de enfoque de la imagen, para probarlos y optimizarlos. En la siguiente sección se realiza una serie de pruebas comparativas de tales algoritmos y se evalúan los resultados, y en la última sección se expone el desarrollo de la función de medida de foco

[1] El procesamiento digital de imágenes puede interpretarse en términos de desplazamientos, filtrados, convoluciones y demás operaciones entre matrices. Una excelente aproximación a esta interpretación del procesamiento de imágenes en una amplia variedad de libros, entre los cuales se puede encontrar en [1,2,3].

basada en los resultados de la sección anterior. Igualmente la función es sometida a prueba y se evalúan los resultados

1. 1. ALGORITMOS DE MEDIDA DE FOCO

A continuación se evalúan los resultados de la implementación de un conjunto de algoritmos que en la literatura han sido utilizados para evaluar el grado de enfoque de imágenes. Los algoritmos se pueden clasificar en cinco grupos, según se basen en: diferenciación de imágenes, medida del contraste de la imagen, histograma, medidas de autocorrelación y funciones del dominio de la frecuencia. Además de los algoritmos expuestos, se analizaron y probaron otros algoritmos[2] propuestos en la literatura, pero que no son expuestos en detalle ya que su desempeño no fue considerado meritorio para un análisis más profundo y detallado.

1.1.1 DIFERENCIACIÓN DE IMÁGENES

Los algoritmos para estimación de foco basados en diferenciación de imágenes se basan en el hecho de que una imagen mejor enfocada, por su nitidez, presenta mayores cambios en las intensidades de píxeles vecinos. De esta forma, una operación de diferenciación entre la imagen original y su versión desplazada (desplazamiento de uno o más píxeles)

$$g(x,y) = f(x,y) - h(x,y) \quad (1)$$

podrá utilizarse como figura de mérito para calcular el grado relativo de enfoque de la imagen ya que de esta forma se presenta un realce de sus diferencias

En este primer grupo se evaluaron los métodos: Gradiente Absoluto con umbral (TAG) y dos variantes propuestas por los autores denominadas Promedio del Gradiente Absoluto (PGA) y Conteo del Gradiente Absoluto (CGA)), el método Suma de la Magnitud de la Diferencia (SMD) y el método Gradiente al cuadrado (SG),

[2] Ver Anexo A

1.1.1.1. Gradiente absoluto con umbral (TAG) y Suma de la Magnitud de la Diferencia (SMD).

Consiste en calcular la diferencia entre la matriz I(x,y), que representa la imagen, con la matriz desplazada I(x,y+1). Dicha diferencia se acumula siempre que se encuentre por encima de un umbral **V** [9].

$$FM = \sum_{M}\sum_{N}\left|I(x, y+1) - I(x, y)\right| \quad para, \left|I(x, y+1) - I(x, y)\right| \geq V \qquad (2)$$

$$FM = \sum_{M}\sum_{N}\left|I(x, y) - I(x, y+1)\right| + \left|I(x, y) - I(x+1, y)\right| \qquad (3)$$

Donde I(x,y) es una matriz MxN y *FM* es la medida del grado de enfoque. La ecuación 2 corresponde al algoritmo TAG, y la ecuación 3 corresponde al algoritmo SMD, la cual tiene en cuenta las variaciones horizontales y verticales de la imagen. Al definir si se debería considerar las variaciones verticales o las horizontales en la imagen se decidió y verificó que este factor no es importante para la aplicación, puesto que en muestras de tejidos humanos, la información se distribuye sin seguir un patrón particular. Los resultados sugieren que el algoritmo SMD hace un cálculo innecesariamente redundante de las variaciones de la imagen en ambas direcciones. Por lo tanto, a costa de un mayor tiempo de cómputo, el algoritmo SMD no implica necesariamente una estimación más efectiva de la medida del grado de foco de una imagen. Sin embargo, para la implementación del algoritmo TAG se optó por considerar las variaciones horizontales, puesto que en el plano horizontal hay mayor cantidad de información por tener un mayor número de píxeles. Con el fin de mantener la efectividad de los algoritmos y optimizar los tiempos de cómputo, para su implementación se consideró apropiado el uso de datos en formato de enteros precisión sencilla (SINGLE), evitando errores por truncamiento al operar sobre formatos de números de enteros sin signo (UINT8, UINT16) o tiempos de cómputo excesivos al operar sobre un formato de doble precisión (DOUBLE). Para verificar lo anteriormente expuesto, en pruebas preliminares se programó

el algoritmo TAG con umbral igual a cero y se procesaron un total de 25 imágenes de microscopía[3]. Los resultados mostraron que el procesamiento en formato de doble precisión, en promedio, incrementaba los tiempos de cómputo por encima del 75%.

Otro aspecto a resaltar es la determinación del umbral V. La literatura consultada no sugiere criterios para la selección de este umbral, se recurrió a realizar análisis del conjunto de imágenes prueba, variando el parámetro *V*. Los resultados pueden observarse en la figura 3 y 4 [4]. Se observa en general que a medida que se aumenta *V,* la curva de la medida de enfoque se hace más estrecha, realzando los valores máximos (correspondiente a las imágenes con mejor enfoque) y anulando en algunas ocasiones imágenes fuera de foco (la sumatoria es igual a cero). Además, de este análisis se observa que V debe estar entre el intervalo $0<V<40$, ya que en algunos casos por encima de este valor se observa que el valor máximo ya no corresponde con la imagen mejor enfocada y el algoritmo empieza a perder efectividad. La incorporación del umbral incrementa en un 50% el tiempo de cómputo respecto a la implementación del algoritmo sin umbral, debido al proceso adicional de comparación. Más adelante, se proponen dos modificaciones del algoritmo (Algoritmos PGA y CGA), con resultados cualitativos comparables.

[3] Imágenes en escala de grises 480x640 píxeles, tomadas con cámara Olympus C7070 desde microscopio Olympus CX31 con montura tipo C. Este grupo de imágenes es usado con frecuencia, más adelante en este informe, para probar otros algoritmos de estimación de medida de foco. En adelante, se hará referencia a este conjunto de imágenes como "imágenes prueba".

[4] Las imágenes fueron adquiridas realizando movimientos equi-espaciados del micrométrico en una dirección, y se enumeraron ordenadamente a medida que se realizaba tal adquisición.

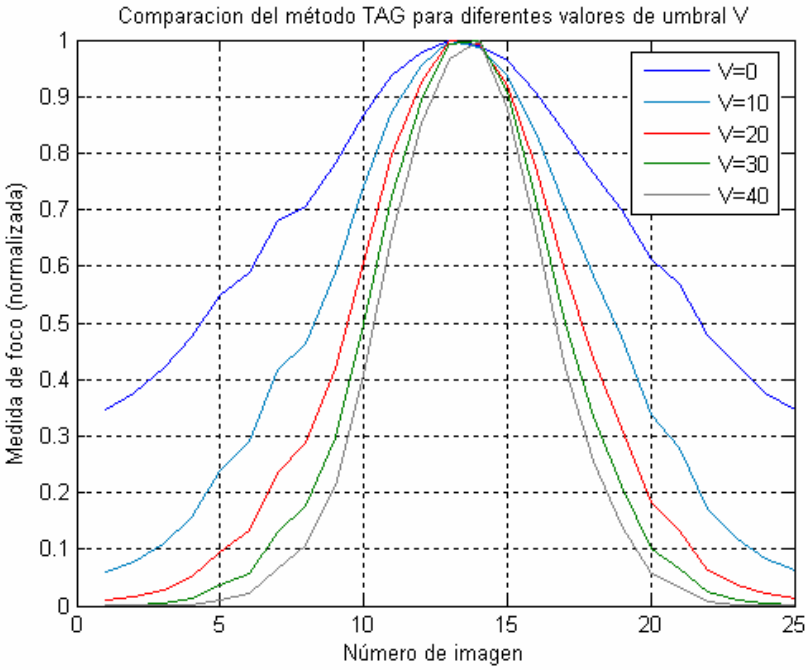


Figura 3. Pruebas comparativas del método TAG con diferentes valores de umbral. **Fuente**: autores.

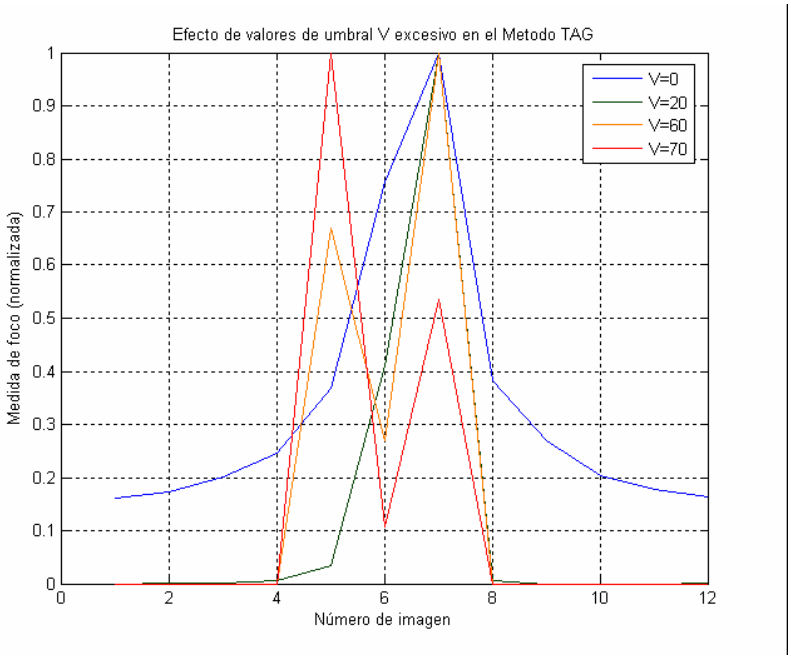


Figura 4. Efectos del valor excesivo en los valores del umbral para el método TAG. **Fuente**: autores.

1.1.1.2. Conteo del gradiente absoluto (CGA)

Este algoritmo es propuesto por los autores de este informe, con base en el algoritmo TAG. Consiste en remplazar la sumatoria de la ecuación 2, por un conteo de píxeles con valores por encima de V:

$$FM = \sum_{x=1}^{M}\sum_{y=1}^{N} s[|\, I(x,y) - I(x,y+1)\,|, V] \qquad (5)$$

$$s[x,V] = \begin{cases} 0, x \le V \\ 1, x > V \end{cases}$$

La figura 5 muestra los resultados de aplicar este algoritmo al conjunto de *imágenes prueba* para distintos valores de *V*. comparados con el algoritmo TAG.

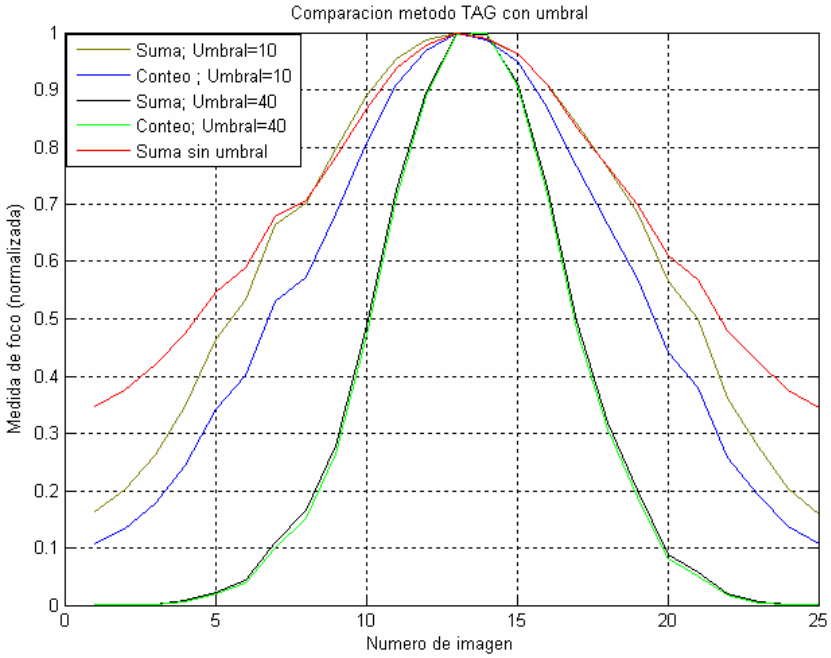


Figura 5. Muestra de los resultados comparativos del algoritmo CGA con el algoritmo TAG. **Fuente**: autores.

1.1.1.3. Promedio del gradiente absoluto (PGA).

Este algoritmo es propuesto por los autores de este informe, con base en el algoritmo TAG. Se fundamenta en los mismos principios del algoritmo TAG pero se define según la ecuación 6. En este algoritmo para la estimación del grado de enfoque de una imagen, se propone el valor promedio de la diferencia de la imagen con su versión desplazada como la figura de mérito, eliminándose el uso del umbral:

$$FM = \frac{1}{MN}\sum_{y=1}^{M}\sum_{x=1}^{N}\left|I(x, y+1) - I(x, y)\right| \qquad (6)$$

FM es la medida del grado relativo de enfoque de la imagen representada digitalmente por la matriz MxN, I*(x,y*).

Definiendo la matriz diferencia como

$$g(x, y) = \left|I(x, y+1) - I(x, y)\right| \qquad (7)$$

El valor de intensidad de g(x,y) para cada píxel puede considerarse como una variable aleatoria. Así, el proceso de seleccionar cualquier píxel g*(j,k)* de la matriz diferencia es un proceso aleatorio y el valor de intensidad de dicho píxel es una variable aleatoria. Para una revisión del concepto de proceso aleatorio y variable aleatoria revisar el capítulo 4 de [7].

Según lo anterior, se puede definir la variable aleatoria $X_i = g(x,y)$, cuyos valores corresponden al resultado de llevar a cabo el experimento de seleccionar la intensidad de cualquier píxel en posición *(x,y)*. Siendo X_i la variable aleatoria asociada al conjunto de valores que puede tomar el proceso aleatorio, puede emplearse un resumen de estos valores, tal como el promedio (la media), para identificar el valor central de la variable aleatoria [7,8]. De esta manera, el valor promedio de la matriz *g(x,y)* es una medida de tendencia central que representa cada uno de los valores de toda la matriz. Entonces, la ecuación 7 puede utilizarse para estimar el grado de enfoque de una imagen cualquiera.

El algoritmo PGA puede considerarse una variación del algoritmo TAG si se toma la ecuación 2 y se normaliza por el número de píxeles de la imagen (MxN) y se hace el umbral **V** igual a cero. Sin embargo, al programar el algoritmo PAG es de esperarse un menor costo computacional porque se evita el proceso de comparación con un umbral. Para el algoritmo PAG, las consideraciones en cuanto a formato de representación numérica y selección entre variaciones verticales u horizontales de la imagen son similares a las del algoritmo TAG.

La evaluación del algoritmo PAG sobre el conjunto de *imágenes prueba* mostró resultados satisfactorios.

1.1.1.4. Gradiente al cuadrado (SG).

Se computa como el TAG pero sumando la magnitud de la diferencia al cuadrado. Al elevar al cuadrado se busca atenuar el efecto de gradientes pequeños y acentuar el de gradientes grandes [9].

$$FM = \sum_{M}\sum_{N}\left|I(x, y+1) - I(x, y)\right|^2 \quad para, \left|I(x, y+1) - I(x, y)\right| \geq V \tag{8}$$

El desarrollo del algoritmo SG es similar al del algoritmo TAG. Sin embargo, dado que en SG se requiere calcular el cuadrado de la diferencia entre dos imágenes, es necesario que las operaciones se lleven a cabo con números con precisión de 16 bits, o más, para evitar problemas de truncamiento. Pruebas preliminares mostraron que el algoritmo SG incrementaba sus tiempos de cómputo hasta en un 32% al hacer los cálculos en doble precisión comparados con este mismo proceso con formato enteros sin signo de 16 bits . La figura 6 compara los resultados de aplicar el algoritmo SG al conjunto de *imágenes prueba*, comparados con los resultados de aplicar TAG.

Al observar los resultados normalizados es posible verificar con mayor claridad el efecto de atenuación que reciben las imágenes con menores gradientes (las

que tiene menor grado de enfoque) en su figura de mérito *FM*. Estos resultados son estudiados y analizados con mayor profundidad en la siguiente sección de este documento.

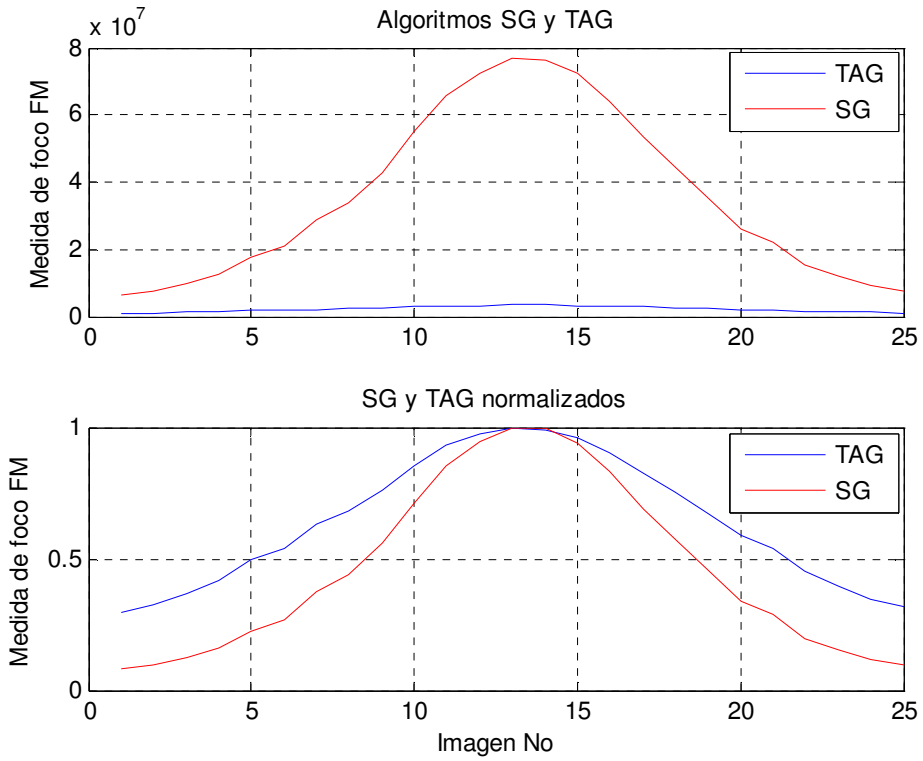


Figura 6. Resultados de analizar conjunto de 25 imágenes de la misma escena pero con distinto grado de enfoque con los algoritmos TAG y SG. En la parte superior aparecen los resultados originales. En la parte inferior los resultados son normalizados de 0 a 1 para compararlos con mayor facilidad. **Fuente**: autores.

1.1.2. TÉCNICAS DE SEGMENTACIÓN

Los algoritmos basados en técnicas de segmentación tienen en cuenta que las imágenes mejor enfocadas presentarán mayor definición en sus bordes. Éstos algoritmos aplican técnicas usadas en detección de bordes para hacer una estimación del grado de enfoque.

Las principales técnicas usadas en segmentación que pueden ser utilizadas para la estimación del grado de foco de una imagen son dos: las que calculan

el gradiente de la imagen y las que calculan su segunda derivada. En [1] se expone la utilización de estas técnicas para la detección de bordes. El gradiente y la segunda derivada de una imagen son también usados para el mejoramiento de imágenes tal como se puede revisar de [2] y en [4].

El gradiente de una imagen I(x,y) es otra matriz G(x,y) cuyos valores se determinan comparando la intensidad del píxel en la posición (x,y) con la de sus vecinos y estableciendo en qué dirección y con qué magnitud se produce el máximo cambio en la intensidad de la imagen. Matemáticamente, el gradiente de una imagen I(x,y) en cada posición (x,y) viene dado por el vector:

$$\nabla I = \begin{bmatrix} G_x \\ G_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial I}{\partial x} \\ \frac{\partial I}{\partial y} \end{bmatrix} \qquad (9)$$

1.1.2.1. Algoritmo Tenengrad (TEN)

Consiste en calcular el gradiente de la imagen y estimar su grado de enfoque como [4]:

$$FM = \sum_{x=1}^{M} \sum_{y=1}^{N} \left| G(x, y) \right| \qquad (10)$$

donde G(x,y) es el gradiente de la imagen I(x,y) y $|G(x,y)|$ es su magnitud.

Algunas referencias [10 y 11] proponen el uso de un umbral para la sumatoria de la ecuación 10. Sin embargo, en este trabajo se optó por trabajar el algoritmo TEN tal como se sugiere en [4]: sin umbral.

A continuación se exponen la metodología para el cálculo del gradiente y algunas consideraciones sobre el formato numérico a utilizar

Cálculo del gradiente.

En la literatura se propone una manera de estimar digitalmente el gradiente de una imagen [1,2,3,4], que consiste en filtrar o convolucionar la imagen I(x,y) con unas máscaras predefinidas conocidas como *operadores*:

$$\begin{aligned} Gx &= I(x,y) * Sx \\ Gy &= I(x,y) * Sy \end{aligned} \qquad (11)$$

Donde G_x y G_y son las componentes en X y en Y del gradiente, respectivamente, y S_x y S_y son los operadores. S_x y S_y pueden ser seleccionados de varios operadores entre los cuales se destacan los de Roberts, Prewitt, Sobel [1] y Frei-Cheng. De los operadores anteriormente mencionados se selecciona el de Sobel por su amplia aceptación y por ser el que típicamente se propone en la definición del algoritmo TEN [9,10,11]. La ecuación 12 muestra los valores de S_x y S_y para el operador de Sobel.

$$Sx = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 2 & 0 & -2 \\ 1 & 0 & -1 \end{bmatrix} \qquad Sy = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix} \qquad (12)$$

Una vez calculadas las componentes G_x y G_y del gradiente, es necesario calcular el valor de su magnitud, el cual puede estimarse como:

$$|G| = |\nabla I| = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \qquad (13)$$

Sin embargo, la ecuación anterior implica elevar las matrices G_x y G_y al cuadrado, sumarlas y luego sacar la raíz cuadrada al resultado. Estas operaciones representan un alto costo computacional que podría afectar considerablemente la velocidad del algoritmo. Es una práctica común, sin embargo, aproximar la magnitud del gradiente con los valores absolutos en vez de los cuadrados y la raíz [2]:

$$|G| \approx |G_x| + |G_y| \qquad (14)$$

Para decidir entre la ecuación 13 y la 14 para calcular la magnitud del gradiente de la imagen, es necesario hacer pruebas y comparar los resultados confrontando las variables *tiempo de cómputo* vs *efectividad en la estimación*

del grado de foco. Para este propósito, se programó el algoritmo TEN, con los operadores de Sobel, en formato de precisión sencilla[5], aplicando tanto la ecuación 13 (algoritmo TEN1) como la 14 (algoritmo TEN2) para la estimación de la magnitud del gradiente. Las dos versiones del algoritmo se aplicaron al conjunto de *imágenes prueba*. Los resultados se muestran en la figura 7.

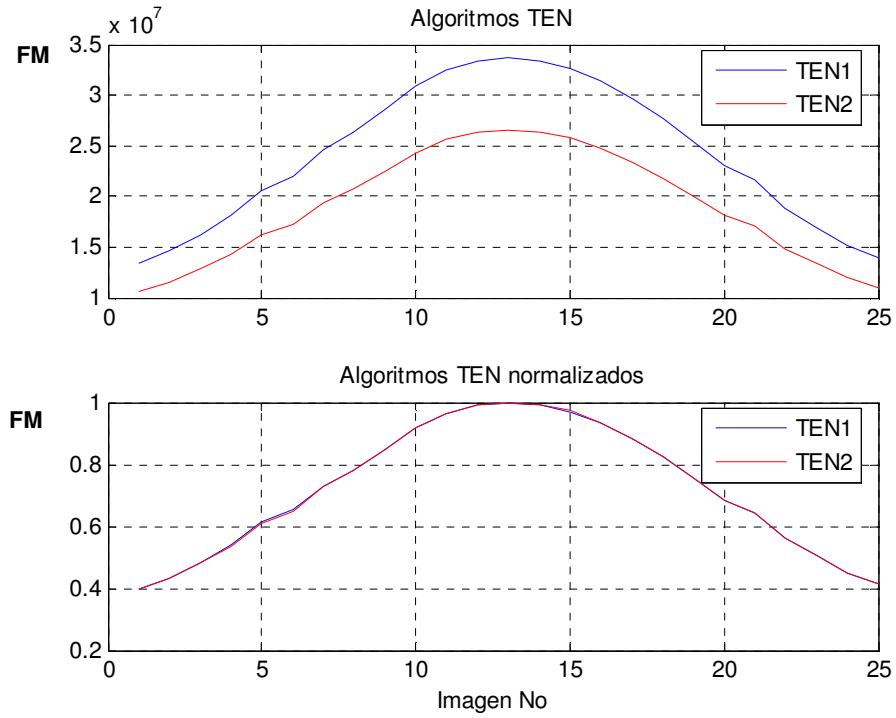


Figura 7. Resultados de aplicar TEN desarrollado con la ecuación 13 (TEN1, en azul) y con la ecuación 14 (TEN2, en rojo). Arriba los resultados originales; abajo los resultados normalizados de 0 a 1 para su comparación cualitativa. **Fuente**: autores.

La comparación de los resultados normalizados de la figura 7 sugiere que la aplicación de una u otra definición de la magnitud del gradiente (ecuación 13 o 14) no afecta significativamente los resultados. De hecho, las funciones TEN1 y TEN2 normalizadas nunca difieren por encima del 1% en sus resultados. Sin embargo, contrario a las expectativas, la aproximación de la ecuación 14

[5] Más adelante se consideran los efectos de utilizar distintos formatos de representación numérica. En este punto ese parámetro se mantiene invariable para no afectar los análisis realizados.

incrementó, en promedio, los tiempos de cómputo en un 9%.). Sin embargo, es importante resaltar que ambas aproximaciones para la estimación de la magnitud del gradiente resultaron válidas para la definición del algoritmo de medida de foco.

Formato de representación numérica

Dadas las operaciones de multiplicación y sumas acumulativas implícitas en el proceso de convolución con una máscara (que se lleva a cabo para estimar el gradiente) y las operaciones de elevar al cuadrado (al calcular la magnitud del gradiente), es claro que el formato uint8 presentará serios efectos de redondeo y truncamiento. El formato UINT16 evita los truncamientos al elevar al cuadrado pero elimina (al redondear a cero) las componentes de G_x y G_y que sean negativas. El formato de precisión sencilla elimina los efectos anteriores pero incrementa los tiempos de cómputo (por implicar operaciones con 32 bits en vez de 16 u 8). Con formato de doble precisión se consiguen los mismos resultados que con precisión sencilla incrementando innecesariamente los tiempos de cómputo (por esta razón no se contempla esta opción).

Teniendo en cuenta lo anterior, para analizar los efectos del formato de representación numérica sobre la estimación del gradiente de una imagen, se procedió a hallar el gradiente de la imagen mostrada en la figura 8a, utilizando formatos uint8, uint16 y single.

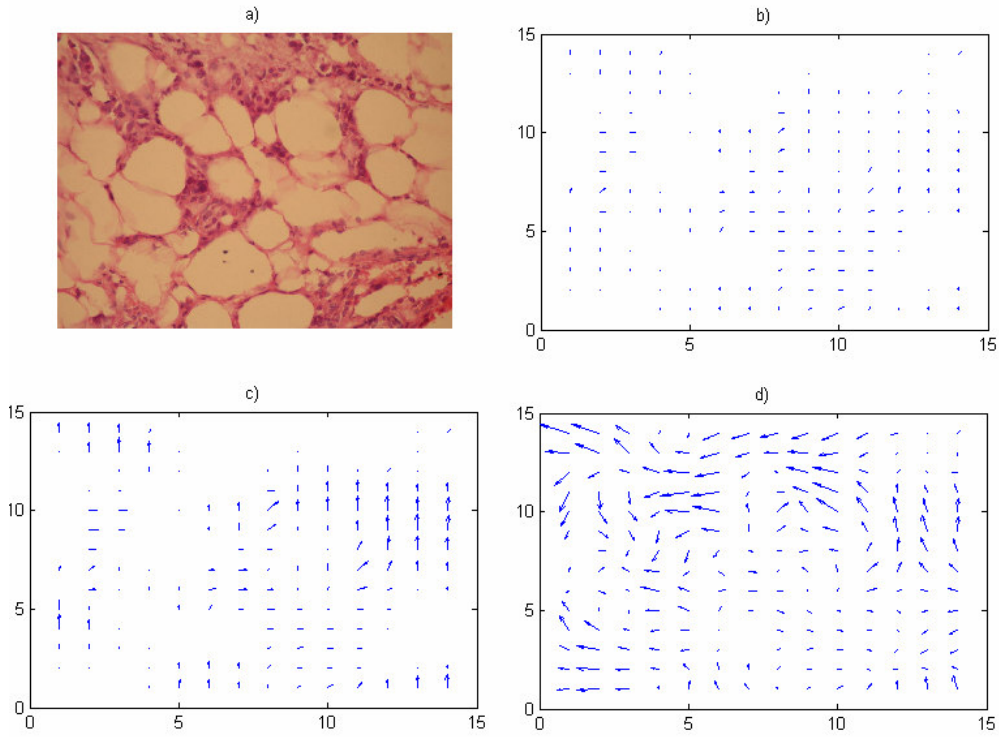


Figura 8. Calculo del gradiente de una imagen. a) Imagen prueba a la que se le calculó el gradiente. b) Representación de pequeña porción del gradiente calculado utilizando formato uint8. c) Representación del gradiente calculado en formato uin16. d) Representación del gradiente calculado en formato de precisión sencilla. **Fuente**: autores.

La figura 8 sugiere que si se estima la magnitud del gradiente utilizando la ecuación 13, se debe utilizar (al menos) formato SINGLE, para evitar problemas de truncamiento. Sin embargo, se puede proponer una nueva definición del algoritmo si se utiliza la ecuación 14 y si además se emplean datos en formato uint8. aunque de esta forma no se consideren las variaciones en las direcciones negativas ni en X ni en Y del gradiente (efecto del truncamiento a cero de los valores negativos). Es de esperarse que el desempeño del algoritmo no se vea afectado significativamente, ya que estadísticamente el aporte a la medida del grado de enfoque de la componente positiva es aproximadamente igual a la negativa.

Para decidir finalmente en qué formato conviene programar el algoritmo TEN se programan tres versiones del algoritmo: TENS, que opera usando datos en formato de precisión sencilla; TEN16, que opera datos en formato UINT16 y TEN8 que opera datos en formato UINT8. Para TEN8 se aplica la modificación propuesta en la definición del algoritmo con el objetivo de evitar los efectos del truncamiento[6]:

$$FM(TEN8) = \sum_{x=1}^{M}\sum_{y=1}^{N}\left(\left|G_x\right| + \left|G_y\right|\right) \qquad (15)$$

La figura 9 compara los resultados de aplicar los tres algoritmos al conjunto de imágenes prueba. En la parte superior es posible observar que el algoritmo TENS estima mayores valores de enfoque para las imágenes, lo cual se puede entender al recordar que los algoritmos TEN16 y TEN8 sólo consideran las direcciones positivas del gradiente. Aunque el desempeño cualitativo de los tres algoritmos es comparable, el algoritmo TENS obtuvo, en promedio, mayores tiempos de cómputo. El algoritmo TEN16 mejoró los tiempos de ejecución cerca de un 7%. El algoritmo TEN8, en cambio, mejoró los tiempos de cómputo en un 74%, lo cual representa una ventaja notable.

[6] Esta nueva definición corresponde a una propuesta de los autores de este documento.

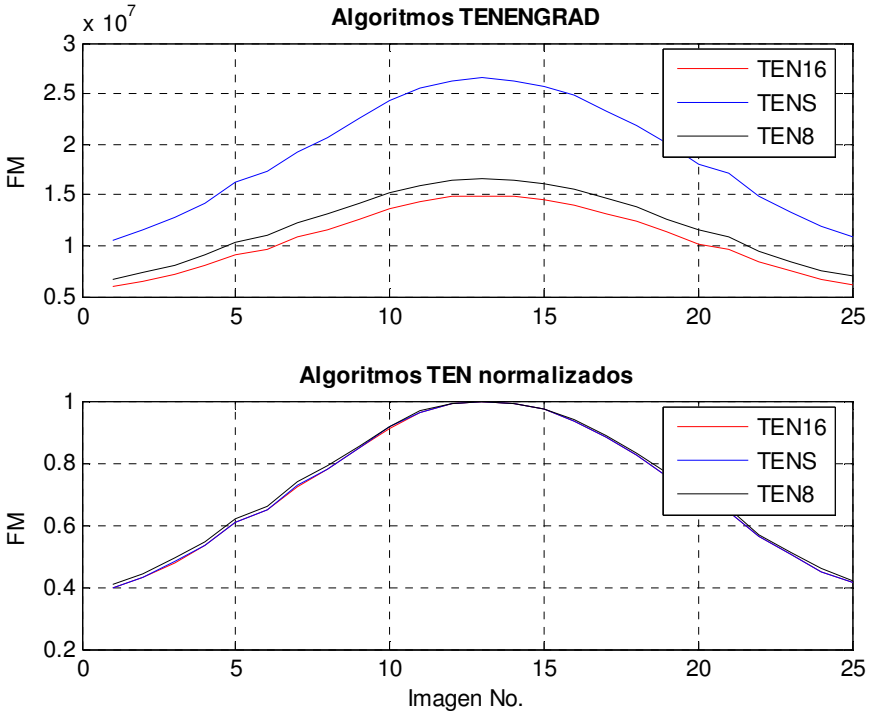


Figura 9. Resultados de aplicar algoritmos TENS (en azul), TEN16 (en rojo) y TEN8 (en negro) a conjunto de imágenes prueba. Arriba, resultados originales; abajo, resultados normalizados para comparación cualitativa. **Fuente**: autores.

1.1.2.2. Varianza Del Gradiente (VDG)

Otra alternativa para utilizar la información del gradiente de la imagen es calcular la varianza de la magnitud del mismo [12]. Con base en esta idea, un nuevo algoritmo para la estimación del grado de enfoque de una imagen sería:

$$FM = \sum_{x=1}^{M}\sum_{y=1}^{N}\left[\left|G(x,y)\right| - \overline{G}\right]^2 \text{ ,para } |G(x,y)| > \mathbf{V} \qquad (16)$$

Donde $\overline{G}$ es la media de la magnitud del gradiente y V corresponde a un umbral. Revisando los resultados obtenidos al analizar la definición del algoritmo TEN, decidimos modificar también la definición de VDG, y hacer el cálculo de la magnitud del gradiente mediante la ecuación 14. El algoritmo resultante fue denominado VDG8. [7]

[7] Para la definición de VDG8 se sugiere además la eliminación del umbral *V*, como se verá mas adelante.

En la definición del algoritmo VDG se utiliza un umbral que debe seleccionarse cuidadosamente. Este algoritmo propone además una interpretación estadística de la información aportada por la magnitud del gradiente de la imagen. A continuación se exponen algunos aspectos sobre el tratamiento estadístico del gradiente con el fin de evaluar las posibilidades del algoritmo como herramienta para la estimación del grado de enfoque de una imagen y buscar la manera mas efectiva de programarlo, Las consideraciones respecto a formato de representación numérica son similares a las del algoritmo TEN.

Si consideramos la variable aleatoria $X_i = |G(x,y)|$ para cualquier punto (x,y), podremos calcular su varianza y su media. A manera de ejemplo, la tabla 1 compara los valores de media y varianza para la variable aleatoria X_i asociada a seis imágenes con distinto grado de enfoque. Las imágenes fueron etiquetadas de Im1 a Im6 y corresponden a imágenes de la misma escena, pero con distinto grado de enfoque[8] (Im1 peor foco, Im6 imagen enfocada).

Variable aleato...	μ	σ^2
$X_i(\lvert \nabla Im1 \rvert)$	6.078	48.75
$X_i(\lvert \nabla Im2 \rvert)$	6.908	66.79
$X_i(\lvert \nabla Im3 \rvert)$	7.978	99.67
$X_i(\lvert \nabla Im4 \rvert)$	10.58	222.92
$X_i(\lvert \nabla Im5 \rvert)$	16.79	801.96
$X_i(\lvert \nabla Im6 \rvert)$	22.54	1736.13

Tabla 1. Media y varianza para la variable aleatoria asociada a la magnitud del gradiente de las imágenes Im1-Im6. Im1 corresponde a la imagen de peor foco e Im6 a la de mejor foco.

En general, a medida que aumenta el grado de enfoque de una imagen, aumenta el valor de la varianza de la magnitud del gradiente de dicha imagen. Este comportamiento es predecible si se considera que, a medida que aumenta el grado de enfoque de una imagen, su gradiente toma un rango más amplio de

[8] Imágenes en escala de grises de 480x640 píxeles tomadas con cámara Olympus C7070 desde microcopio Olympus CX31.

valores. Es decir, para una imagen mal enfocada los valores de su gradiente son pequeños y se hallan poco dispersos; mientras que, para una imagen mejor enfocada, el gradiente toma valores que van desde los muy pequeños hasta los mas grandes.

La ecuación 16 indica que sólo se deben acumular los valores del gradiente que se encuentran por encima de dicho umbral. Para analizar el efecto del umbral, se redefinió la varianza[9] y se estudió el comportamiento de la función:

$$fm_x = \int_V^{\infty} (x-\mu)^2 f(x)dx \qquad (17)$$

Donde *f(x)* es la distribución de probabilidad de X_i y corresponde a la distribución *Gamma*:

$$f(x) = \begin{cases} \dfrac{\lambda e^{-\lambda x}(\lambda x)^{\alpha-1}}{\Gamma(\alpha)}, x \geq 0 \\ 0, x \leq 0 \end{cases} \qquad (18)$$

Se escoge la distribución *gamma* por estar definida sólo para valores positivos de la variable aleatoria (la magnitud del gradiente nunca es negativa). Los valores de □ y □ se pueden calcular a partir de la media y la varianza de la variable aleatoria[10]. Para ilustrar que la distribución *gamma* se puede utilizar para modelar el gradiente de una imagen, la figura 10 muestra el histograma de la magnitud del gradiente de las imágenes Im1 a Im6 (izquierda) y su modelo estadístico (derecha).

La ecuación 17 describe, en términos de probabilidad, el comportamiento de la medida de foco propuesta en la ecuación 16, en función del parámetro ***V***. La figura 11 muestra la función fm_x para las imágenes Im1-Im6.

[9] Para la definición de varianza referirse a [8]

[10] Para más información sobre la distribución gamma y su aplicabilidad consultar [7] y [8].

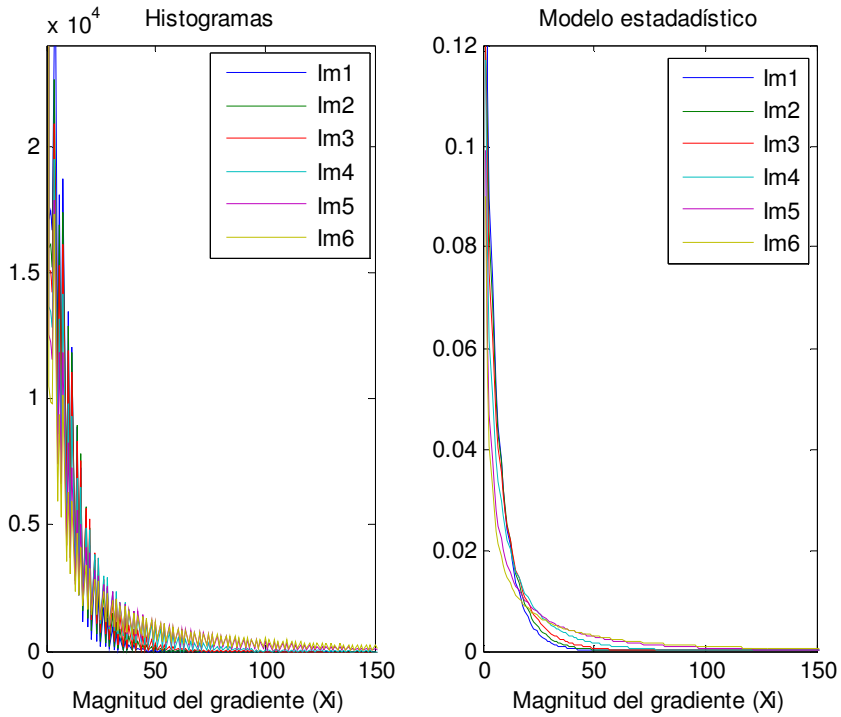


Figura 10. Comparación del modelo estadístico de distribución *gamma* con histograma de los datos reales. Izquierda: histograma de los datos. Derecha: modelo estadístico. **Fuente**: autores.

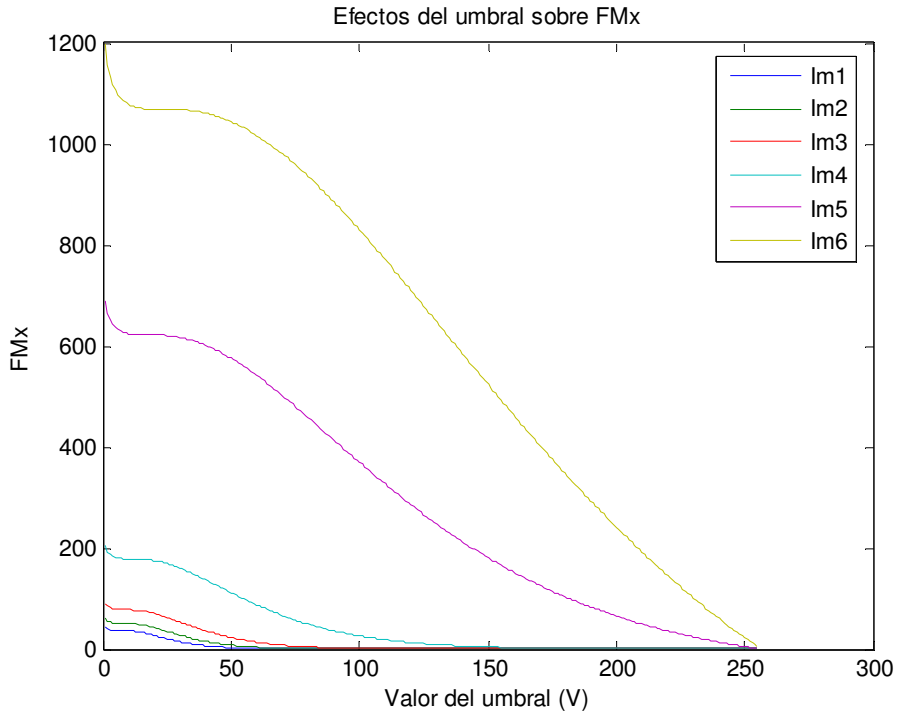


Figura 11. Efectos del umbral *V* sobre FMx. **Fuente**: autores.

El comportamiento descrito por la figura 11 sugiere que independiente del valor del umbral *V*, las imágenes mejor enfocadas siempre mantienen un valor mayor de *FM*. Por tal motivo, resulta apropiado eliminar el umbral de la ecuación 16. Esto simplificará la definición del algoritmo VDG8. Pruebas preliminares mostraron que VDG8 mejoraba los tiempos de cómputo hasta en un 60% respecto a la VDG.

1.1.2.3. Algoritmo Laplacian (LAP)

Al igual que el gradiente, la segunda derivada también tiene aplicación en la detección de bordes [1] y en el mejoramiento de imágenes [2]. La segunda derivada de una imagen se puede estimar mediante el laplaciano, el cual se define como:

$$L(I) = \nabla^2(I) = \frac{\partial I^2}{\partial^2 x} + \frac{\partial I^2}{\partial^2 y} \qquad (19)$$

Para la estimación mediante Laplaciano de la segunda derivada de una imagen I(x,y) en un píxel de posición (x,y), se puede utilizar cualquiera de los operadores de la ecuación 20 [1].

$$\nabla^2 \approx \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \qquad \nabla^2 \approx \begin{bmatrix} 1 & 4 & 1 \\ 4 & -20 & 4 \\ 1 & 4 & 1 \end{bmatrix} \qquad (20)$$

Las consideraciones respecto al formato numérico, para el caso del algoritmo LAP, son similares a las del algoritmo TEN: las componentes negativas que son despreciadas por los formatos uint8 y uint16 no tienen mayor incidencia sobre el desempeño cualitativo del algoritmo. En cuanto al umbral, la figura 12 muestra el comportamiento de *FM*, para las imágenes Im1-Im6 para distintos valores del umbral.

Nuevamente, la supresión del umbral en la definición del algoritmo de estimación de foco es aconsejable. La relación entre las figuras de mérito *FM* para imágenes con distinto grado de enfoque se mantiene de forma casi independiente del valor seleccionado del umbral.

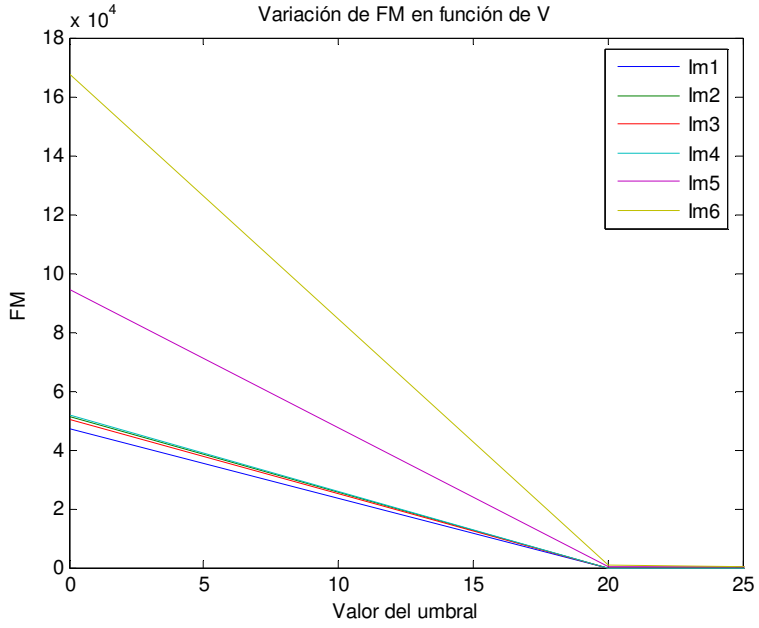


Figura 12. Comportamiento de *FM* en función del umbral para el algoritmo LAP. **Fuente**: autores.

1.1.3. TÉCNICAS EN BASE AL HISTOGRAMA

El histograma de una imagen puede ser usado para el mejoramiento de la misma [1,2,4]. Algunos algoritmos de medida de foco utilizan la información del histograma para hacer una estimación del grado de enfoque de una imagen.

1.1.3.1. Algoritmo Entropía (ENT)

Este método ha sido sugerido basando su funcionamiento en la definición de entropía como la medida de la información [2], que para el caso de imágenes, es la contenida en su histograma [9,10]. La función propuesta se define como

$$FM = -\sum_{k} h_k \log(h_k) \qquad (21)$$

donde h_k corresponde a la frecuencia de la tonalidad r_k en la imagen. A continuación se muestran diferentes definiciones de la entropía:

$$E_{shanon} = -\sum_{i} h_i^2 \log(h_i^2) \qquad (22)$$

$$E_{\log energy} = \sum_{i} \log(h_i^2) \qquad (23)$$

Los resultados obtenidos aplicados sobre el conjunto de *imágenes prueba* muestran que aplicar la ecuación 21 disminuye en un 8% los tiempos de computo con respecto a la aplicación de la ecuación 22. Sin embargo la aplicación de la ecuación 22 muestra un mejor desempeño cualitativo y se selecciona para la implementación del algoritmo.

1.1.4. TÉCNICAS DEL CONTRASTE DE LA IMAGEN

Los algoritmos de medida de foco, basados en la medida del contraste de la imagen, trabajan directamente sobre la información contenida en la matriz *I(x,y)* con los valores de intensidad asociados a cada píxel de la imagen.

1.1.4.1. Algoritmo Varianza (VAR)

Este método basa su funcionamiento en el hecho de que una imagen mejor enfocada tiene un mayor contraste. Una imagen mejor enfocada presenta una mayor dispersión en los valores de intensidad de sus píxeles. Existen en la documentación dos definiciones diferentes de esta función. En [9,10], se propone:

$$FM = \sum_{M}\sum_{N}(I(x,y)-\bar{I})^2 \qquad (24)$$

Donde $\bar{I}$ es el valor promedio de los valores de los píxeles de la imagen *I.* Para la implementación de esta función se empleó el formato de datos DOUBLE, ya que los valores negativos en la resta de los píxeles con su valor promedio mostraron tener una fuerte incidencia sobre los resultados finales, comparados con un intento por con truncar a cero los valores negativos para emplear de esta forma el formato de datos uint8 y así reducir tiempo de cómputo.

1.1.5. FUNCIONES EN EL DOMINIO DE LA FRECUENCIA

1.1.5.1. Algoritmo de Transformada de Fourier (TFU)

Algoritmo basado en el hecho de que una imagen mejor enfocada tiene transiciones más abruptas entre los valores de píxeles adyacentes (situación que ya ha sido propuesta por si sola como medida de enfoque en los métodos TAG, PGA, BRE, etc), de modo que tiene consecuentemente mayor contenido de frecuencias en su espectro (figura 13).

Con estas consideraciones, ha sido propuesto el uso del contenido de frecuencias de una imagen como medida del grado de enfoque [10]. Este método sin embargo, no ha sido considerado en muchos trabajos sobre algoritmos de medida de foco por los tiempos de cómputo de esta técnica respecto a otras (situación que será objeto de estudio en la siguiente sección de este documento). Se consideró la sumatoria de los valores absolutos de la FFT de la imagen como medida del grado de enfoque:

$$FM = \sum_{M}\sum_{N}\left|H(j,k)\right| \qquad (25)$$

Donde $\left|H(j,k)\right|$ es la magnitud de la FFT en dos dimensiones de la imagen h(x,y) de tamaño MxN.

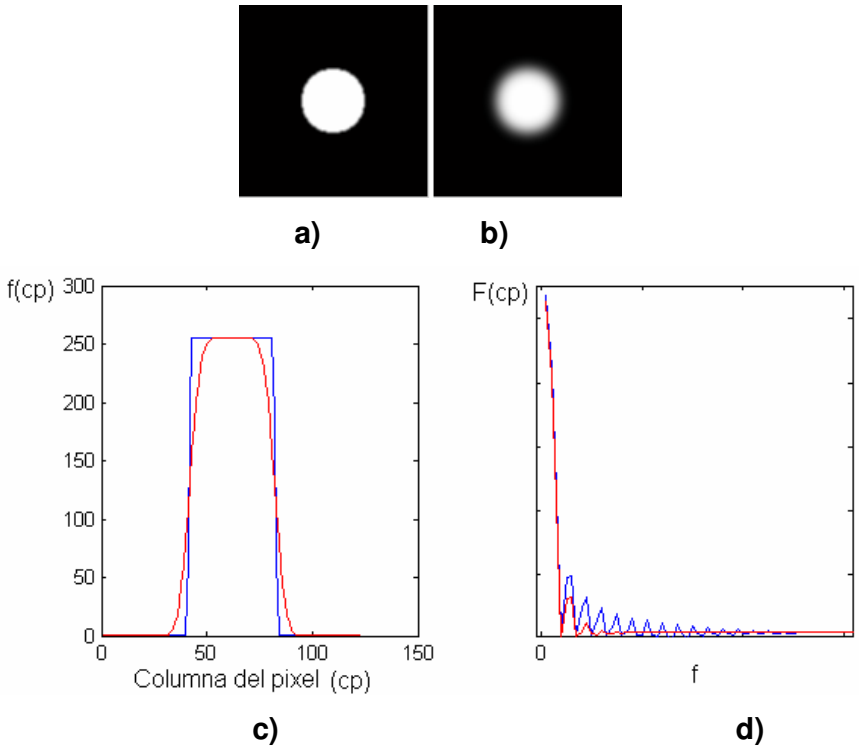


Figura 13. Transformada de Fourier para una imagen a) Imagen en escala de grises de un círculo con mejor grado de enfoque que el mostrado en b). c) Comportamiento de los pixeles de la fila central de la figuras 20a (azul) y 20b (rojo). d) Magnitud de la transformada discreta de Fourier de las señales mostradas en c). **Fuente**: autores.

1.2 COMPARACION DEL DESEMPEÑO DE LOS ALGORITMOS

En esta sección se exponen un conjunto de pruebas comparativas llevadas a cabo sobre los algoritmos expuestos en la sección anterior. El objetivo de realizar este conjunto de pruebas es comparar el funcionamiento de los algoritmos y seleccionar los de mejor desempeño teniendo en cuenta la aplicación para la cual serán utilizados.

La tabla 2 muestra un resumen de los algoritmos analizados esta sección. Para probar y comparar cualitativamente los algoritmos se procedió a crear una base de datos con imágenes de microscopía óptica obtenidas desde el microscopio con la cámara del *sistema de adquisición automática de imágenes* empleados en el presente trabajo. También se incluyeron en la base de datos imágenes adquiridas previamente mediante una cámara Olympus C7070 usando un microscopio Olympus CX31, con el objetivo de analizar el comportamiento de los algoritmos desarrollados. La base de datos fue creada teniendo en cuenta que las imágenes obtenidas debían, en la medida de los posible, reproducir todas las condiciones favorables y desfavorables, bajo las cuales funcionarían los algoritmos de medida del grado de enfoque. Lo anterior se hizo teniendo en cuenta que factores como la cantidad de información visible en la imagen (cantidad de tejido), la iluminación de la escena y la presencia de suciedad en la muestra son factores que pueden afectar significativamente el desempeño de los algoritmos. La tabla 3 muestra un resumen sobre la base de datos, con la que se sometieron a prueba los algoritmos, la cual fue divida en 25 grupos, con un total de 499 imágenes[11]. Para este trabajo los grupos de imágenes de mayor interés corresponden a los grupos del 1 al 10, pues fueron obtenidos mediante los dispositivos y condiciones bajo las cuales va a funcionar el *sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico*. Los grupos 11 al 15, sin embargo, corresponden a imágenes de mejor calidad que sirven para evaluar la efectividad de los algoritmos desarrollados en este trabajo. La figura 14 muestra algunas de las imágenes de esta base de datos. A continuación se exponen los criterios bajo los cuales los algoritmos se compararon para determinar los de mejor desempeño.

[11] Estos grupos de imágenes se pueden observar en el CD adjunto a este informe de proyecto.

Algoritmo	**Sigla**	**Técnica**
Conteo del gradiente absoluto	**CGA**	Diferenciación de imágenes
Entropía	ENT	Histograma
Transformada de Fourier	TFU	Representación en el dominio de la frecuencia
F5 de Vollat	F5V	Medida de autocorrelación
Promedio del gradiente absoluto	**PGA**	Diferenciación de imágenes
Laplaciano	LAP	Detección de bordes
Suma de la magnitud de la diferencia	SMD	Diferenciación de imágenes
Gradiente al cuadrado	SG	Diferenciación de imágenes
Gradiente absoluto con umbral	TAG	Diferenciación de imágenes
Tenengrad modificado	**TEN8**	Detección de bordes
Varianza del gradiente modificada	**VDG8**	Detección de bordes
Varianza	VAR	Contraste de la imagen

Tabla 2. Resumen de los algoritmos de medida de foco estudiados en esta sección. En negrita aparecen los algoritmos propuestos por los autores de este informe.

Grupo de imágenes	Descripción	Comentarios
Para los grupos del 1 al 10, las imágenes corresponden a tejido humano de muestras citológicas, vistas a través de un microscopio *Leitz ORTHOLUX*, y tomadas desde cámara Web con resolución 640x480 píxeles en formato RGB. Para los grupos del 11 al 25, las imágenes corresponden a tejido humano fotografiado a 640x480 píxeles con una cámara Olympus C7070 mediante microscopio Olympus CX31		
Grupo 1 (G1)	21 imágenes vistas con objetivo de 3.5x.	Tejido en toda la imagen. Buena iluminación y poca suciedad en la muestra.
Grupo 2 (G2)	21 imágenes. Objetivo 3.5x	Tejido solo en una porción de la imagen. El resto es espacio vacío. Hay poca suciedad en la muestra y la iluminación es buena
Grupo 3 (G3)	21 imágenes. Objetivo 10x	Características similares al grupo G1 pero con objetivo 10x
Grupo 4 (G4)	21 imágenes. Objetivo 3.5x	Tejido en toda la imagen pero con mucha presencia de suciedad en el cubre objetos.
Grupo 5 (G5)	21 imágenes. Objetivo 3.5x	Tejido solo en una porción de la imagen, mucha suciedad en la muestra.
Grupo 6 (G6)	21 imágenes. Objetivo 10x	Información en toda la imagen pero con baja iluminación en la escena.
Grupos 7 al 10	4 grupos con un total de 104 imágenes	Las imágenes presentan diversas características en cuanto a iluminación, presencia de suciedad en la muestra y cantidad de información.
Grupos del 11 al 25	15 grupos con un total de 248 imágenes con diferentes características	Las imágenes presentan diversas características. Sin embargo, por tratarse de imágenes de una calidad distinta a la de interés para el desarrollo del *sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico*, no se dan mayores especificaciones.

Tabla 3. Sumario de la base de datos de imágenes con la cual se sometieron a prueba los algoritmos.

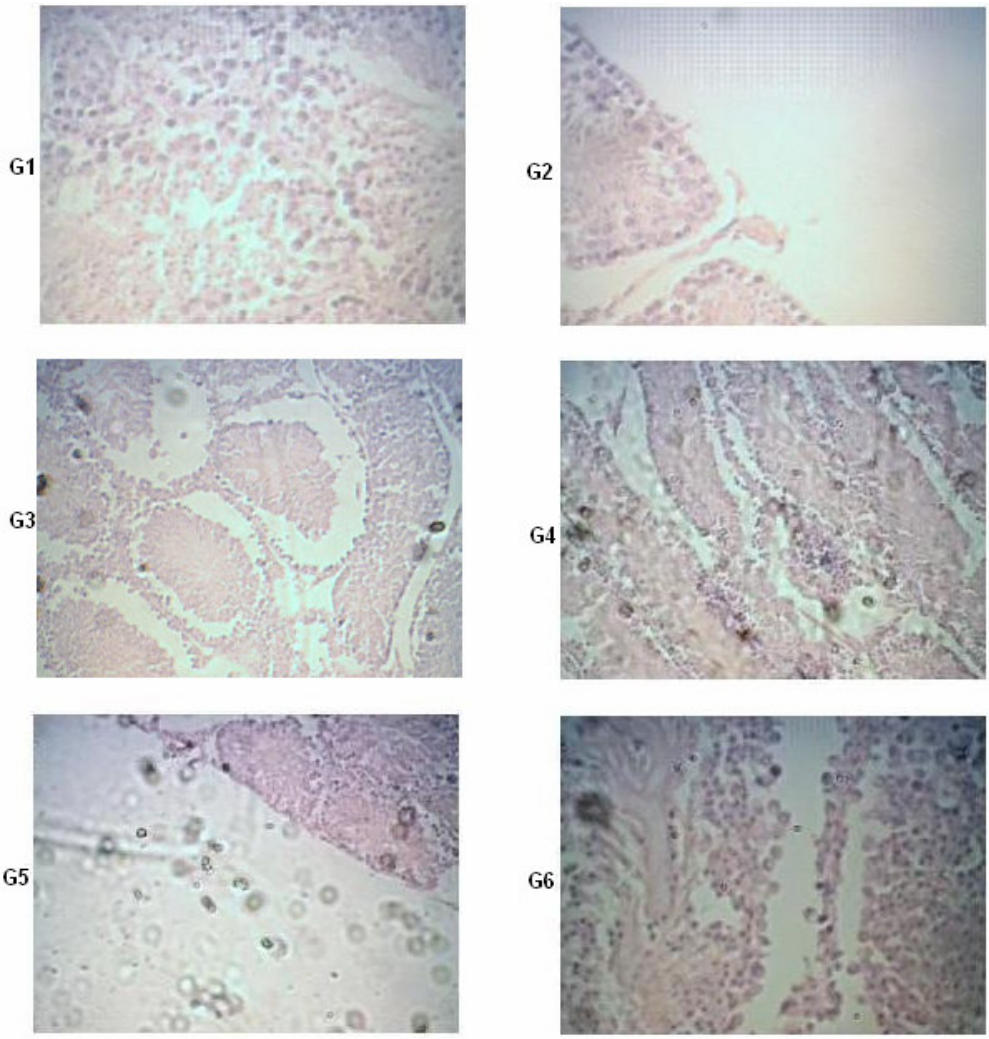


Figura 14. Imágenes de la base de datos. Se muestran las imágenes mejor enfocadas de los grupos G1 al G6. **Fuente**: autores.

1.2.1 CRITERIOS DE EVALUACIÓN

Con el objetivo de poder evaluar y comparar el desempeño de cada algoritmo, fue necesario definir una función que asignara un puntaje a cada algoritmo según su comportamiento al ser aplicados a cada grupo de imágenes. De acuerdo con esto, se definen a continuación los criterios tenidos en cuenta durante la evaluación de los algoritmos, y se define una función *C* que asigna una calificación a cada algoritmo al ser aplicado sobre un grupo de imágenes.

Efectividad (X)

Este criterio es el más importante de todos. La efectividad indica cuándo el algoritmo detecta exitosamente la imagen mejor enfocada de un conjunto de éstas. La efectividad de un algoritmo puede tomar cuatro valores distintos:

X = 1.0, si el máximo valor de *FM* corresponde a la imagen mejor enfocada
X = 0.5, si el máximo de *FM* corresponde a la segunda imagen mejor enfocada
X = 0.25, si el máximo de FM corresponde a la tercera imagen mejor enfocada.
X = 0, para los demás casos.

Tiempo de cómputo (t)

Uno de los criterios más importantes para decidir la aplicabilidad de un algoritmo de autoenfoque es el tiempo de cómputo asociado a la aplicación de este algoritmo a una imagen o conjunto imágenes. En este caso, es importante reducir los tiempos de cómputo al mínimo con el objetivo de hacer el proceso de autoenfoque más rápido y eficiente. En las pruebas expuestas en esta sección el tiempo de cómputo es calculado como el tiempo promedio al aplicar el algoritmo a un grupo completo de imágenes. Es importante anotar que este criterio tiene una fuerte dependencia del equipo de cómputo utilizado para realizar las pruebas. La figura de mérito asociada al tiempo de cómputo para un algoritmo se define como:

$$t = t_n / t\min \qquad (26)$$

Donde t_n es el tiempo promedio por imagen requiere el algoritmo en procesar las imágenes del grupo Gn, y t_{min} corresponde al tiempo de cómputo promedio por imagen del algoritmo más rápido.

Máximos locales (Mf)

Para cualquier algoritmo de enfoque aplicado a un grupo de imágenes, el máximo valor de la figura de mérito *FM* debe corresponder a la imagen con mejor enfoque. Además de lo anterior, teniendo en cuenta el desarrollo del algoritmo de búsqueda de foco (ver capítulo siguiente de este documento), el conjunto de medidas de *FM* del grupo completo de imágenes, idealmente debe corresponder a una función sin máximos locales. Es decir, el único máximo presente en la función debe corresponder al de la imagen con mejor foco. A manera de ejemplo, la figura 15 muestra el resultado de aplicar el algoritmo PGA al grupo de imágenes G1.

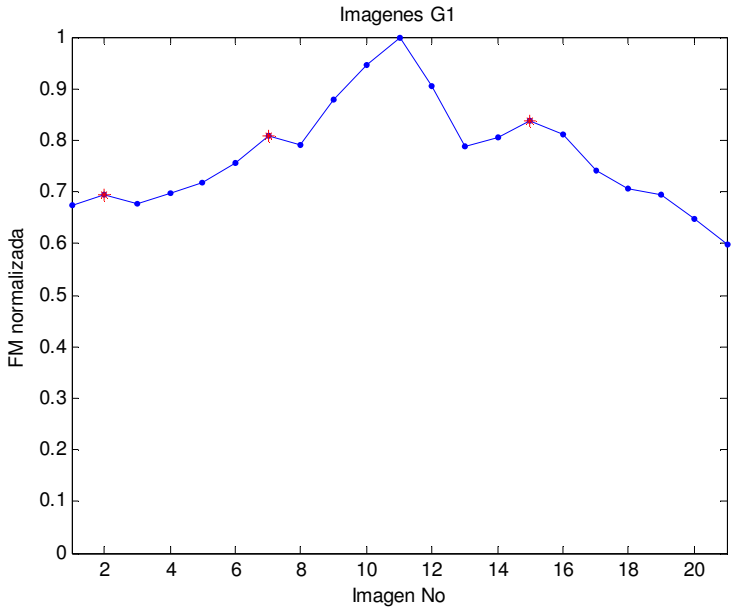


Figura 15. Aplicación del algoritmo PGA a grupo de imágenes G1. En azul, valores de FM para las diferentes imágenes. En rojo, máximos locales. **Fuente**: autores.

De la figura 15 se pueden apreciar máximos locales en las imágenes No 2, 7 y 15 (asteriscos rojos). Esto representa un efecto indeseable al considerar la implementación del algoritmo de búsqueda de foco. Por lo tanto, el número de máximos locales que aparezcan al aplicar un algoritmo a un grupo de imágenes representa un aspecto negativo al evaluar el algoritmo.

Para cada algoritmo *Mf* se define, de manera similar a *t*, como:

$$Mf = M_n/M_{min} \qquad (27)$$

Rango de FM (R_{FM})

El rango de *FM* indica qué tan sensible es un algoritmo a las variaciones en el grado de enfoque de una imagen. Como ejemplo, la figura 16 muestra el resultado normalizado de aplicar los algoritmos PGA y VDG al grupo de imágenes G1.

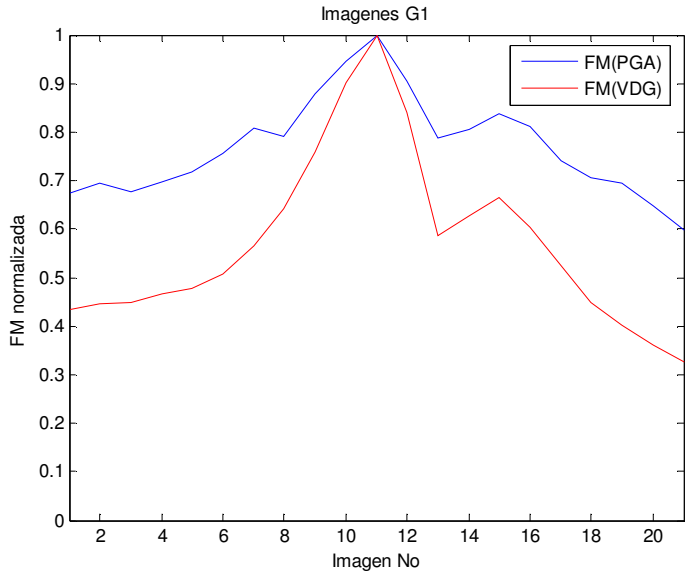


Figura 16. Resultados normalizados de aplicar los algoritmos PGA y VDG a grupo de imágenes G1. **Fuente**: autores.

De la figura 16 se puede apreciar que para el grupo de imágenes G1, la aplicación del algoritmo PGA muestra una variación de *FM* del 40% (entre su

máximo y mínimo valor), mientras que VDG muestra un cambio del 67%. Esto sugiere que VDG fue más sensible a los cambios en el grado de enfoque de las imágenes. Este factor se debe tener en cuenta para de acelerar la velocidad de convergencia del algoritmo de búsqueda del punto de mejor enfoque (ver siguiente capítulo).

R_{FM} para cada algoritmo se define como:

$$R_{FM} = R_{FMn} / R_{FMmax} \qquad (28)$$

Nótese que, en la definición de R_{FM}, se pondera por el mayor rango obtenido en los distintos algoritmos.

Selectividad (S)

Este criterio hace relación a qué tan puntiaguda es la función *FM* en su máximo (en el punto de mejor foco). Para medir este parámetro de la función *FM* se procede a verificar el rango, en número de imágenes, necesario para que la función se eleve del 80% al 100% y de regreso al 80% de su valor. La figura 17 ilustra el proceso de calcular *S* al aplicar el algoritmo VDG al grupo de imágenes G1.

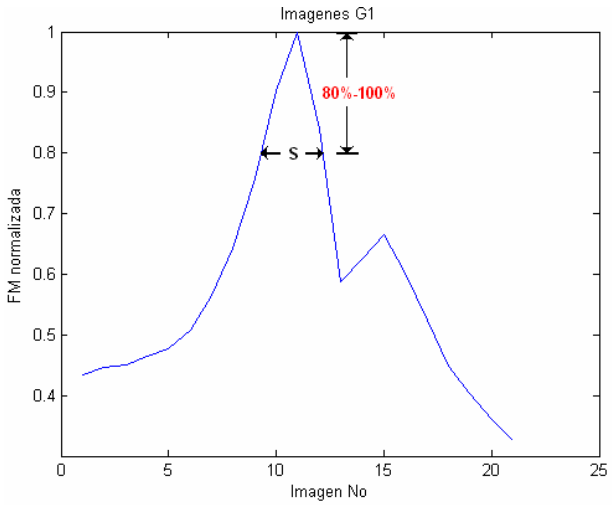


Figura 17. Cálculo de *S* para la aplicación del algoritmo VDG al grupo de imágenes G1. **Fuente**: autores.

Entre menor sea el valor de S, mejor es la evaluación del algoritmo. Entre más puntiaguda sea la función *FM* es de esperar una mayor velocidad de convergencia en al algoritmo de búsqueda de foco.

Para cada algoritmo, *S* se define como:

$$S = S_n / S_{min} \qquad (29)$$

1.2.2 FUNCIÓN DE CALIFICACIÓN

La función para calificar el desempeño de los algoritmos se definió en función de los criterios de evaluación. A cada criterio se le asignó una ponderación entre el 0 y el 100%, dependiendo de su importancia para el desempeño del algoritmo. La tabla 4 muestra las ponderaciones asignadas a cada criterio de evaluación.

Criterio	Ponderación (%)
Máximos falsos (*Mf*)	60
Tiempo de cómputo (*t*)	20
Rango de *FM* (R_{FM})	10
Selectividad (S)	10

Tabla 4. Ponderaciones de los criterios de evaluación utilizados para comparar el desempeño de los algoritmos de medida de foco. **Fuente**: autores.

Según las ponderaciones de la tabla 4, la función para calificar el desempeño de los algoritmos, se definió como:

$$C = X\left[0.6\left(\frac{1}{Mf+1}\right) + 0.2\left(\frac{1}{t}\right) + 0.1\left(R_{FM}\right) + 0.1\left(\frac{1}{S}\right)\right] \qquad (30)$$

Donde *X* es el criterio asociado a la efectividad del algoritmo de medida de foco.

1.2.3 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS.

Las figuras 18 a 20 muestran las medidas de *FM* normalizadas obtenidas al aplicar los diferentes algoritmos al grupo de imágenes G1. La tabla 5 es un

sumario con los diferentes criterios de evaluación para cada algoritmo, al ser aplicados sobre este grupo de imágenes.

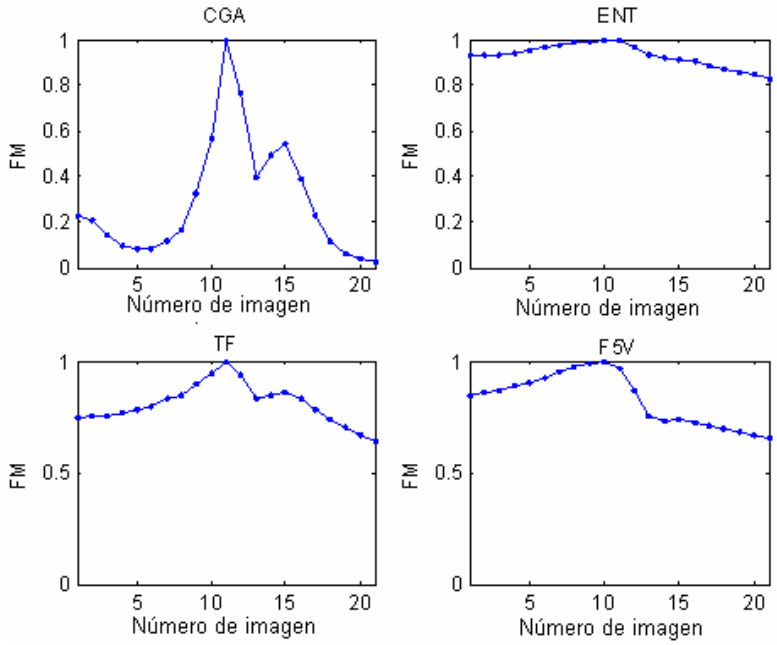


Figura 18. Aplicación de algoritmos CGA, ENT, TF y F5V a grupo de imágenes G1. El algoritmo F5V no acierta en seleccionar la imagen mejor enfocada. **Fuente**: autores.

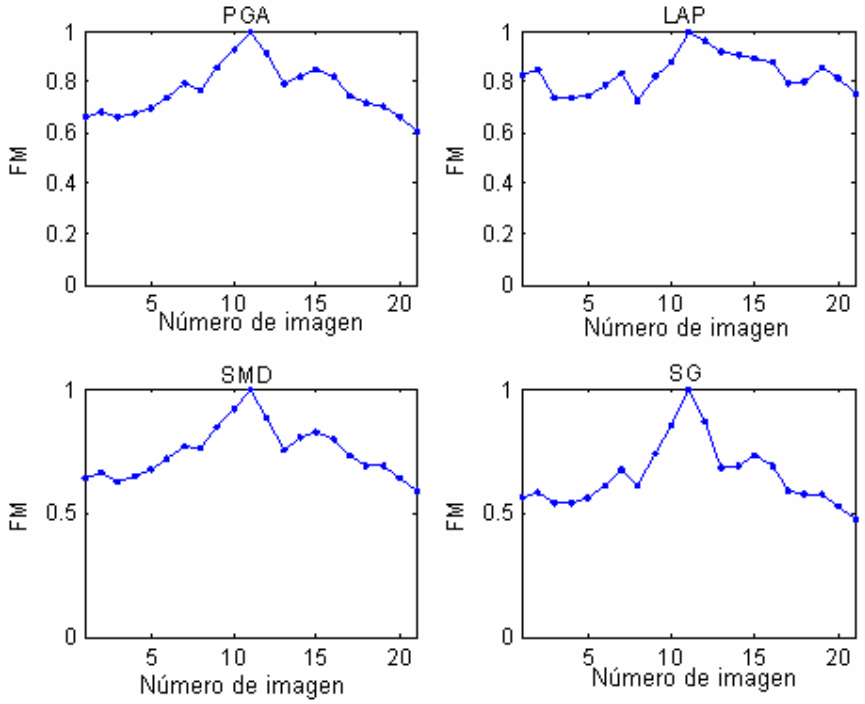


Figura 19. Resultados de aplicar algoritmos PGA, LAP, SMD y SG a grupo de imágenes G1. Todos los algoritmos aciertan en seleccionar la imagen apropiada. **Fuente**: autores.

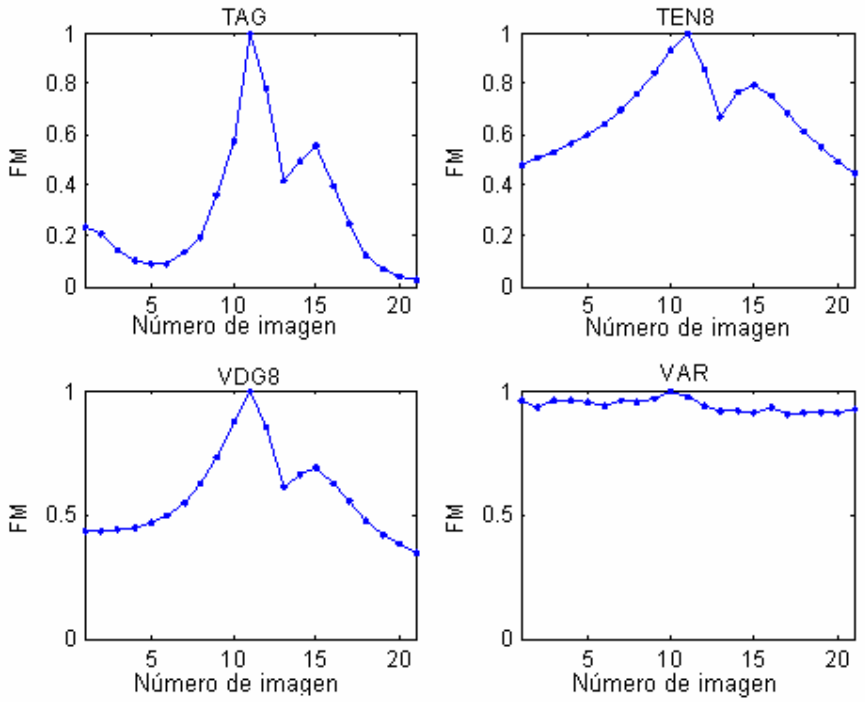


Figura 20. Resultados de aplicar los algoritmos TAG, TEN8, VDG8 y VAR a grupo de imágenes G1. El algoritmo VAR no acierta en la selección de la imagen con mejor foco. **Fuente**: autores.

La tabla 5 muestra los valores de los diferentes criterios de evaluación para cada algoritmo al ser aplicados al grupo de imágenes G1.

Los resultados de la tabla 5 sugieren que, para este caso, los algoritmos de mejor desempeño son **CGA, VDG8**, ENT y **TEN8** (a pesar de que VDG8 y TEN8 se encuentran entre los más lentos). Nótese que ENT falla al seleccionar la imagen de mejor foco. Sin embargo, por no poseer máximos falsos obtiene una buena puntuación. Esto, sin embargo, se debe tener en cuenta al utilizar este algoritmo para el desarrollo de un sistema de autoenfoque.

Algoritmo	Tiempo[12] (ms)	Máximos falsos	Rango de FM (%)	*Selectividad*	Efectividad X	C
CGA	108	1	97	2	1	0.57
ENT	38	0	17	20	0.5	0.42
TF	600	1	36	11	1	0.37
F5V	352	1	35	13	0.5	0.19
PGA	87	3	39	5	1	0.32
LAP	191	3	28	9	1	0.24
SMD	230	3	41	5	1	0.25
SG	176	4	53	4	1	0.26
TAG	294	1	97	2	1	0.53
TEN8	455	1	55	5	1	0.41
VDG8	790	1	65	4	1	0.43
VAR	496	5	10	20	0.5	0.07

Tabla 5. Evaluación del desempeño de los algoritmos de medida de foco al ser aplicados al grupo de imágenes G1. En negrita, las modificaciones a algoritmos propuestas por los autores de este informe.

Las figuras 18 a 20 y la tabla 5 son sólo una muestra de la manera en que se sometieron a prueba los algoritmos y se comparó su desempeño. El procedimiento anteriormente descrito se repitió para los grupos de imágenes G2 al G25. La tabla 6 muestra un resumen de las calificaciones obtenidas por cada algoritmo para los grupos de imágenes más representativos.

Si bien la tabla 6 muestra criterios del desempeño de los algoritmos sólo para algunos de los grupos estudiados, este resultado es bastante importante pues en los grupos de la tabla 6 se resumen casi todas las condiciones bajo las cuales van a funcionar los algoritmos estudiados. Además, al hacer conclusiones y tomar decisiones respecto a los algoritmos, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos al analizar todos los grupos de imágenes. La tabla 6 es sólo una ilustración de este proceso.

[12] Tiempos medidos en equipo con procesados Pentium III de 850MHz con 256Mb de RAM.

Algoritmo	Calificación (C)						
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	$\overline{C}$
CGA	0.57	0	0.45	0.57	0	0.63	**0.37**
ENT	0.41	0.19	0.21	0	0	0	**0.14**
TF	0.37	0.33	0.70	0.37	0.43	0.41	**0.44**
F5V	0.18	0.19	0.35	0.34	0.21	0.25	**0.25**
PGA	0.32	0.29	0.41	0.37	0	0.43	**0.30**
LAP	0.24	0.05	0	0.34	0	0	**0.11**
SMD	0.25	0.12	0.34	0.33	0	0.34	**0.23**
SG	0.26	0.29	0.32	0.40	0	0.40	**0.28**
TAG	0.53	0.32	0.42	0.54	0	0.25	**0.34**
TEN8	0.41	0.14	0.76	0.41	0	0.57	**0.38**
VDG8	0.43	0.35	0.73	0.35	0	0.60	**0.41**
VAR	0.07	0.09	0.04	0.07	0.05	0	**0.05**

Tabla 6. Calificaciones obtenidas por los algoritmos de medida de foco al ser aplicados a los grupos de imágenes del G1 al G6. En rojo aparecen los casos para los cuales los algoritmos no detectaron acertadamente la imagen de mejor foco.

En este punto se hizo una preselección de algunos algoritmos teniendo en cuenta su confiabilidad al detectar la imagen con mejor foco. Según este criterio, se descartó la utilización de los algoritmos VAR, ENT, F5V y LAP por ser los que fallan con mayor frecuencia. A continuación se exponen algunos comentarios sobre cada uno de los algoritmos estudiados (excluyendo los cuatro algoritmos ya descartados).

CGA

Este algoritmo acertó en seleccionar las imágenes de mejor foco excepto en grupos con imágenes con poca información de tejidos. Esto sugiere que este algoritmo es confiable si se puede asegurar un buen contenido de información en la imagen. Se caracteriza por presentar siempre un pequeño número de Máximos falsos y un amplio rango en los valores de *FM* (es bastante sensible a los cambios de foco)

TFU

Falla sólo en el grupo G2 que corresponde a una imagen limpia pero con poca información de tejido. Es de los algoritmos más lentos pero en general no presenta máximos falsos y es el menos sensible a la presencia de suciedad en la muestra, lo cual es muy importante. El rango de *FM* es pequeño (entre 22 y 42%).

PGA

Falló sólo en el grupo G5 que corresponde a imágenes con mucha suciedad y poca información de tejido. En imágenes con poca información o poca iluminación presenta mayor número de máximos falsos. Es de los algoritmos más rápidos.

SMD

Falla en imágenes con poca información de tejido. Con frecuencia presenta múltiples máximos falsos. Tiene un rango pequeño de *FM* (entre el 21 y 45%).

SG

Falla sólo con imágenes de mucha suciedad y poca información de tejido. Presenta múltiples máximos falsos y rango de *FM* medio (entre el 35 y el 60%).

TAG

Falla en los grupos G5 y G6 (poca información y poca iluminación, respectivamente). A veces, presenta múltiples máximos falsos. Tiene un amplio rango de *FM* (entre el 53 y el 98%)

TEN8

Falla en los grupos con imágenes con poca información. Es lento pero, con frecuencia, presenta pocos máximos falsos. *FM* presenta un rango amplio (entre 42 y 90%)

VDG8

Falla en los grupos con imágenes con poca información de tejido. Es lento pero presenta pocos máximos falsos (uno o ninguno).

1.2.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

En esta sección se hace un análisis más profundo de los resultados obtenidos al llevar a cabo las pruebas descritas en la sección anterior. El análisis realizado tiene como objetivo establecer bajo qué condiciones los algoritmos tienen el mejor desempeño y qué variables afectan negativamente su rendimiento. Dentro de las variables que afectan en rendimiento del los algoritmos, se discute la mala iluminación de la imagen, la presencia de suciedad en la muestra, el formato de la imagen procesada (RGB o escala de grises) y la reducida cantidad de información en la imagen (la presencia de poco tejido). A continuación se exponen las variables anteriormente mencionadas.

Iluminación de la imagen

Los resultados de aplicar los algoritmos al grupo G6 (imagen con baja iluminación) no sugieren mayor incidencia de este factor en la confiabilidad del resultado. Además del análisis del desempeño de los algoritmos con el grupo G6, se procedió a evaluar los resultados de aplicar los algoritmos a una misma muestra, primero con buena iluminación (grupo G10) y luego con baja iluminación[13] (ver figura 21). La reducción en la iluminación parece afectar positivamente los algoritmos basados en diferenciación de imágenes (PGA, SG y SMD). En general, sin embargo, la baja iluminación parece incrementar el número de máximos falsos en todos los algoritmos.

[13] Se procesaron un total de 42 imágenes en escala de grises de 640x480 píxeles tomadas desde microscopio Leitz Ortholux con cámara Web.

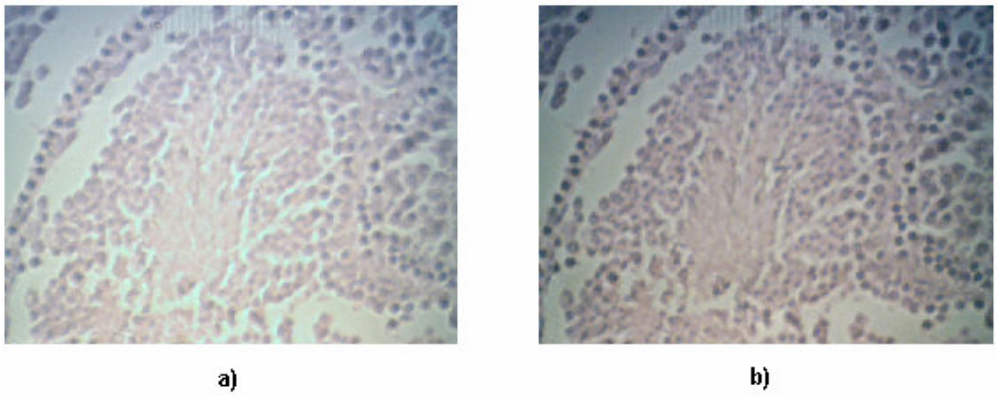


Figura 21. Efecto de la iluminación sobre el desempeño de los algoritmos de medida de foco. a) Imagen con iluminación normal. b) Imagen con baja iluminación. **Fuente**: autores.

Suciedad en la muestra

En muestras de tejidos humanos (y otras muestras de microscopía óptica) es factible encontrar suciedad. Esta suciedad es generalmente debida a partículas de polvo que se acumulan sobre la muestra, encima del portaobjeto, o durante la preparación de la misma. El problema con la presencia de suciedad en la muestra es que éste se acumula en un plano focal diferente al que se encuentra el tejido que debe ser observado. La figura 22 ilustra este fenómeno.

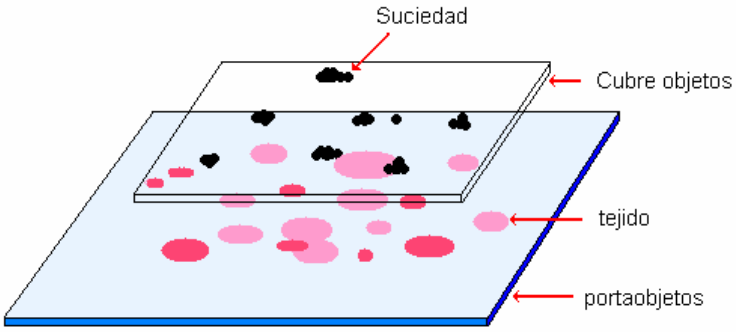


Figura 22. Acumulación de suciedad sobre muestras de microscopía. La suciedad generalmente se acumula en un plano focal distinto correspondiente a la superficie del cubre objetos. **Fuente**: autores.

Algunos algoritmos mostraron una mayor sensibilidad que otros a la presencia de suciedad en la muestra. La figura 23a muestra los resultados de aplicar el

algoritmo TAG al grupo de imágenes G4. Las figura 23b y 23c muestras las imágenes No 1 y 11 del grupo G8, respectivamente. En ésta se hace evidente que la primera imagen del grupo G8 exhibe un valor alto de *FM* que se debe a la presencia de suciedad en dicha imagen. La figura 24 muestra los resultados de aplicar el algoritmo TEN8 al mismo grupo de imágenes.

Al comparar la figura 24 con la 23a, es evidente que el algoritmo TEN8 es menos sensible a la presencia de suciedad en la muestra que el algoritmo TAG.

Los algoritmos que mostraron mayor sensibilidad a la presencia de suciedad en la muestra fueron aquellos basados en diferenciación de imágenes. Los menos sensibles a este factor fueron los basados en transformada de Fourier y detección de bordes (gradiente de la imagen).

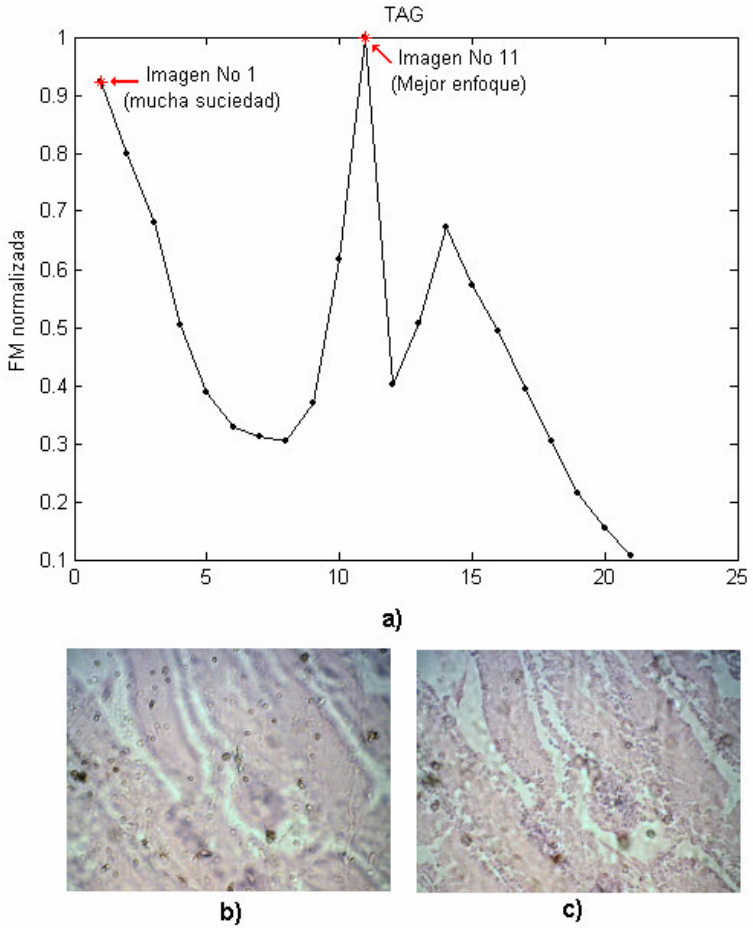


Figura 23. a) Resultados de aplicar TAG al grupo G4**. b)** Imagen No 1 del grupo G4 (plano con suciedad)**. c)** Imagen No 11 del grupo G4 (corresponde a la mejor enfocada)**. Fuente:** autores**.**

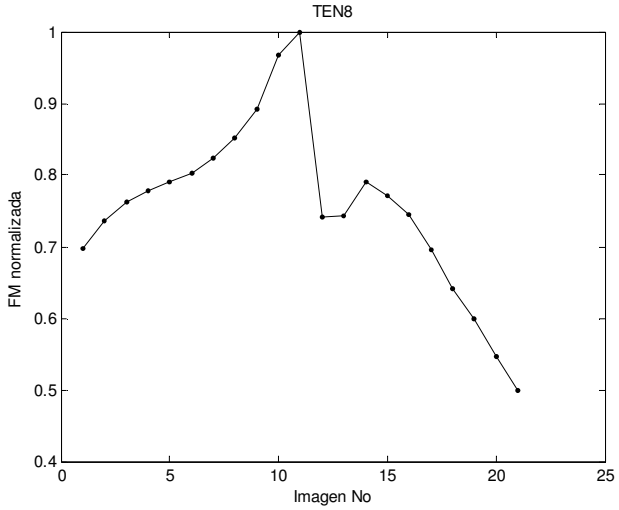


Figura 24. Resultados normalizados de aplicar el algoritmo TEN8 al grupo de imágenes G4. **Fuente**: autores.

Formato de la imagen procesada

Los algoritmos para la estimación del grado relativo de enfoque de una imagen fueron implementados de manera que son capaces de procesar un plano de una imagen en RGB o, en su defecto, procesan la versión en escala de grises de dicha imagen. La figura 25 muestra los resultados de aplicar el algoritmo TEN8 a un grupo de imágenes analizando separadamente los planos R, G y B, y las versiones en escala de grises de las imágenes. Resultados similares se observan para los demás algoritmos. Aunque cualitativamente las diferencias entre analizar un plano u otro (o la imagen en escala de grises) no son tan significativas, en general para los grupos del G1 al G10, se obtuvieron mejores resultados al procesar el plano rojo de la imagen RGB (caso en el cual se presentaban menor número de máximos falsos). Para los grupos del G11 al G25 (que corresponden a imágenes de mayor calidad), los mejores resultados se obtienen al procesar el plano verde de la imagen.

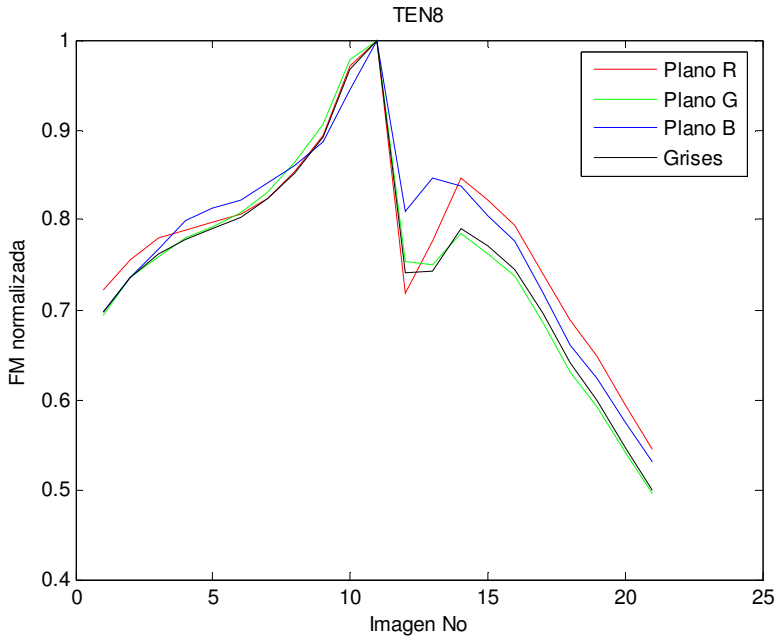


Figura 25. Resultados de aplicar el algoritmo TEN a un grupo de imágenes. En rojo, los resultados de aplicar el algoritmo al plano R de las imágenes en RGB. En verde, los resultados al analizar el plano G. En azul, los resultados de analizar el plano B. En negro, los resultados de procesar las imágenes en escala de grises. **Fuente**: autores.

Cantidad de información en la imagen

En las pruebas realizadas a los algoritmos de estimación del enfoque, la cantidad de información disponible en la imagen (cantidad de tejido visible en la misma) demostró ser el factor de mayor incidencia en la determinación exitosa de la imagen con mejor grado de enfoque. En las pruebas realizadas ninguno de los algoritmos exhibió ventaja alguna al analizar imágenes con poca información. Todos mostraron una alta sensibilidad a la cantidad de información presente en la imagen. Este representa, por lo tanto, un factor crítico al desarrollar la función de medida de enfoque de una imagen.

1.3 FUNCIÓN DE ESTIMACIÓN DE FOCO

En esta sección se expone la función de estimación de foco desarrollada teniendo en cuenta los resultados de la sección anterior. Los algoritmos para la estimación del grado de enfoque de una imagen deben utilizarse de la manera más conveniente para obtener el mejor rendimiento de los mismos. De esta manera, la función de estimación de foco desarrollada, permite utilizar los algoritmos anteriormente expuestos bajo diferentes condiciones.

1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FUNCIÓN

Al desarrollar algoritmos capaces de estimar el grado de enfoque de una imagen, se puede pensar en efectuar un conjunto de operaciones o pre-proceso a la imagen a analizar, para luego sí aplicar dichos algoritmos. Este pre-procesamiento de la imagen podría incluir seleccionar un plano de color de la imagen RGB, o su transformación a escala de grises, o la selección de un área de interés. Igualmente, si se disponen de varios algoritmos para la estimación del grado de enfoque de una imagen, se debe seleccionar cual de todos se aplica.

El desarrollo de esta función se hace teniendo en cuenta que será aplicada, no solo en el sistema de adquisición automática de imágenes del cual es objeto este proyecto, sino que también representa un aporte del proyecto al desarrollo

de algoritmos de autoenfoque en la Universidad Industrial de Santander. La función es desarrollada, por lo tanto, pensando en que cumpla exitosamente su función dentro del *sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico*, sin dejar a un lado su versatilidad y aplicabilidad para ser utilizada en otras aplicaciones.

Compatibilidad de la función

Pensando en la versatibilidad de la función, ésta se desarrolló para ser compatible con imágenes en formato de representación numérica uint8, uint16 o de doble precisión.

Algoritmo de medición de foco

En la sección anterior se estudió el desempeño de 12 algoritmos para la medición del grado de enfoque de una imagen. En un proceso de preselección se descartó el uso de los algoritmos ENT, F5V, LAP y VAR. Los algoritmos restantes se pueden agrupar en cuatro grupos que reúnen los algoritmos que, bajo diferentes condiciones, tienen desempeño muy similar. En el primer grupo, se encuentran los algoritmos CGA y TAG, que se caracterizan por hacer uso de un umbral en su definición y basarse en diferenciación de imágenes para la estimación del grado de enfoque de la imagen. En el segundo grupo, se pueden agrupar los algoritmos SMD, SG y PGA, basados también en diferenciación de imágenes, pero sin umbrales. El tercer grupo incluye TEN8 y VDG8, basados en la detección de bordes mediante el gradiente de la imagen. El último grupo incluye al algoritmo TFU, basado en transformada de Fourier. La figura 26 permite comparar los resultados de aplicar los grupos de algoritmos anteriormente mencionados al conjunto de imágenes G1.

Si de acuerdo con las pruebas comparativas de la sección anterior, se selecciona un solo algoritmo por cada grupo, los algoritmos seleccionados (correspondientes a los de mejor desempeño) son **CGA**, **PGA**, **TEN8** y TFU.

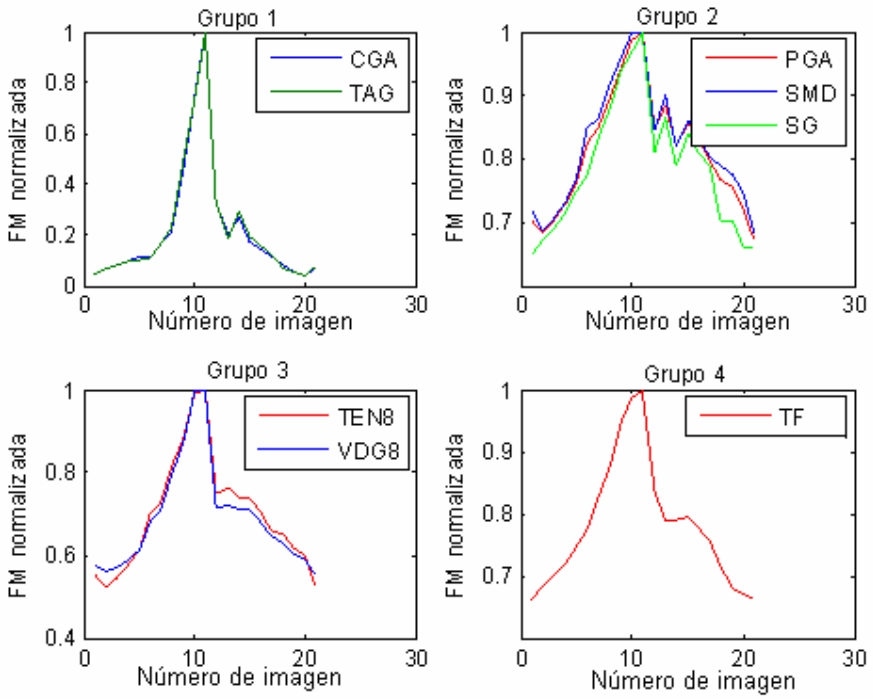


Figura 26. Aplicación de los cuatro grupos de algoritmos al conjunto de imágenes G1. **Fuente**: autores.

Los cuatro algoritmos anteriormente mencionados son los utilizados en el sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico. Sin embargo, la función para estimación del grado de enfoque de una imagen es desarrollada de manera que permite utilizar cualquiera de los doce algoritmos originales.

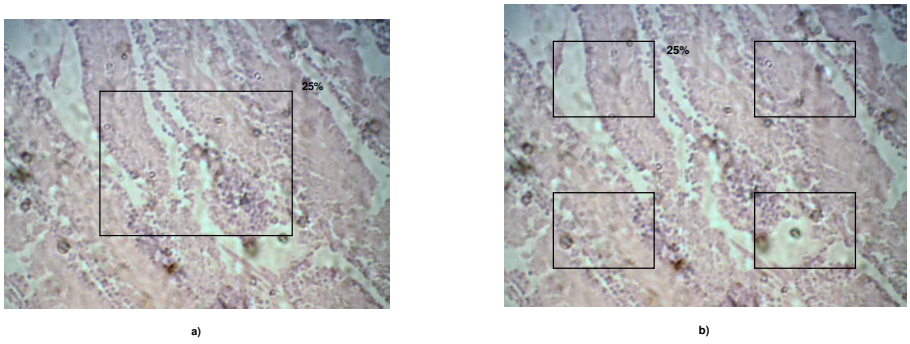
Plano de medición.

En la sección anterior se comentaron los efectos de analizar un plano de la imagen RGB o su versión en escala de grises. Si bien los resultados eran cualitativamente similares, el análisis del plano Rojo de la versión RGB de las imágenes mostró, en general, mejores resultados (para los grupos G1 al G10). Sin embargo, la función de estimación del grado de enfoque de una imagen es desarrollada de manera que permita la selección cualquiera de los planos para su procesamiento e, inclusive, permita procesar la imagen en escala de grises.

Área y Región de medición

Un factor que incide en el tiempo de procesamiento es el tamaño de la imagen a procesar. Al analizar una porción de la imagen, se reducen los tiempos de cómputo porque se reduce la cantidad de información que se debe procesar sin afectar el rendimiento de los algoritmos (igualemente, en sistemas ópticos con aberraciones de esfericidad, poder definir un área de interés puede ser importante para el usuario). Las figuras 27a y 27b ilustran el proceso de selección de un área de interés en la imagen.

La función para estimación del grado de enfoque de una imagen se desarrolló de manera que permitiera la selección de un área de interés centrada en la imagen, o distribuida en cuatro porciones de ésta. Igualmente, la función para estimación del grado de enfoque permite seleccionar el porcentaje en área que debe ser procesado.



a) b)

Figura 27. Selección de área de interés para estimación del grado de enfoque. a) Área del 25% centrada en la imagen. b) Área del 25% distribuida en cuatro porciones de la imagen. **Fuente**: autores.

1.3.2 PRUEBAS A LA FUNCIÓN DE ESTIMACIÓN DE FOCO

En esta sección se exponen los resultados de llevar a cabo diferentes pruebas sobre la función de estimación de foco que se expuso en la sección anterior. Las pruebas se realizaron teniendo en cuenta los diferentes factores que mostraron afectar el desempeño de los algoritmos (cantidad de información en

la muestra, presencia de suciedad, plano de la imagen RGB a procesar). Las pruebas realizadas se efectuaron sobre los grupos de imágenes G1 al G25 expuestos en la sección anterior, pero cambiando los parámetros de procesamiento de la función de estimación de foco. Para cada uno de los grupos de imágenes G1 al G10 se hicieron pruebas haciendo variaciones del plano de color y del área y región de medición, para un total de 36 combinaciones de parámetros distintas.

Plano de Medición

Las pruebas realizadas a los grupos G1 al G10 comparando los resultados de analizar distintos planos de color o la versión en escala de grises de la imagen sugieren que el plano azul muestra mejores resultados en cuanto a la efectividad de los algoritmos. Es decir, cuando se selecciona mejor enfocada de un grupo de imágenes, en el plano rojo se encontró un mayor porcentaje de éxito. En los grupos G11 al G25, sin embargo, los mejores resultados se obtienen al procesar el plano verde de las imágenes. La tabla 4 muestra los porcentajes de éxito al seleccionar la imagen de mejor foco en los grupos G1 al G25.

Plano	**ÉXITO[14] (%)**	
	Grupos G1-G10	**Grupos G11-G25**
Rojo	**77.5**	96.7
Verde	72.0	**100**
Azul	65.5	93.3
Grises	75.0	93.3

Tabla 7. Porcentajes de éxito al procesar los grupos de imágenes G1 al G11 teniendo en cuenta diferentes planos de la imagen.

[14] Un evento exitoso es considerado cuando el algoritmo selecciona efectivamente la imagen de mejor foco entre un grupo de éstas.

Para los grupos G1 al G11, el procesamiento del plano azul de la imagen resultó sacar ventaja en aquellas imágenes con iluminación deficiente o cantidad de información reducida. En este punto debe tenerse en cuenta que estos grupos de imágenes son de una calidad inferior a la de los grupos G11 al G25. En todo caso, procesar el plano verde de las imágenes da como resultado una función de foco con mejor forma (considerando un algoritmo de búsqueda de foco). La figura 28 muestra el resultado de aplicar el algoritmo TEN8 a los diferentes planos de color del grupo de imágenes G1.

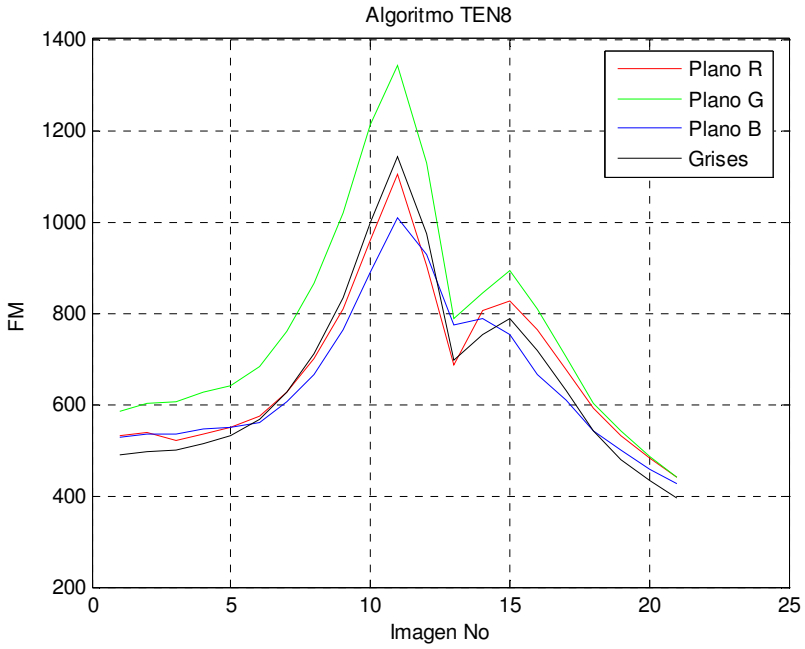


Figura 28. Resultados de aplicar algoritmo TEN8 al grupo de imágenes G1 en diferentes planos de color. **Fuente**: autores.

El comportamiento de la figura 28, en general, se repite para los demás grupos de imágenes: la función de medida de foco muestra una mejor forma al procesar el plano verde de las imágenes.

Área y región de medición

En las pruebas realizadas, el área y la región de la imagen sobre la cual se aplica el algoritmo de estimación de foco mostró ser una variable que se puede

manipular para mejorar considerablemente el rendimiento de la función de estimación del grado relativo de foco.

En general, si se efectúa un análisis sobre una región centrada o distribuida en la imagen no hay mayor incidencia sobre los resultados de estimación de foco. Sin embargo, los cambios en el área de medición afectan considerablemente los tiempos de cómputo, sin afectar negativamente los resultados de la estimación del grado de enfoque. La figura 29 muestra los resultados, sin normalizar, de aplicar los cuatro algoritmos seleccionados anteriormente, a un grupo de imágenes, con diferentes áreas de medición centradas en la imagen.

Los resultados de la figura 29 sugieren que, en general, a medida que se reduce el área de medición, los algoritmos basados en transformada de Fourier (TFU) y diferenciación de imágenes con umbral (CGA, TAG) disminuyen la sensibilidad al reducirse el área de medición. Las técnicas basadas en el análisis del gradiente de la imagen (TEN8 y VDG8) no muestran variaciones significativas para cambios en el área de medida. Por último, el algoritmo PGA, que se basa en una ponderación sobre la diferenciación de la imagen, parece mostrar un refinamiento a medida que se reduce el área de análisis. Esto último se puede explicar si se tiene en cuenta que el efecto de diferenciar una imagen con su versión desplazada y ponderar el resultado por el número de píxeles, se acentúa a medida que se reduce el número de píxeles de la ponderación.

La figura 30 muestra las funciones de enfoque de la figura 29 pero normalizadas. Los resultados expuestos en la figura 30 sugieren que, cualitativamente, la reducción del área de medida no afecta a algoritmos como TFU, CGA y TEN8, mientras que el efecto es positivo para el algoritmo PGA. Las pruebas realizadas con distintas áreas de medición mostraron, para todos los algoritmos, una reducción en los tiempos de cómputo a medida que se reducía el área. Es así como un área de medida del 20% representó una mejora en los tiempos de cómputo entre el 60 y 72% (dependiendo del algoritmo) sin afectar los resultados de la estimación del foco.

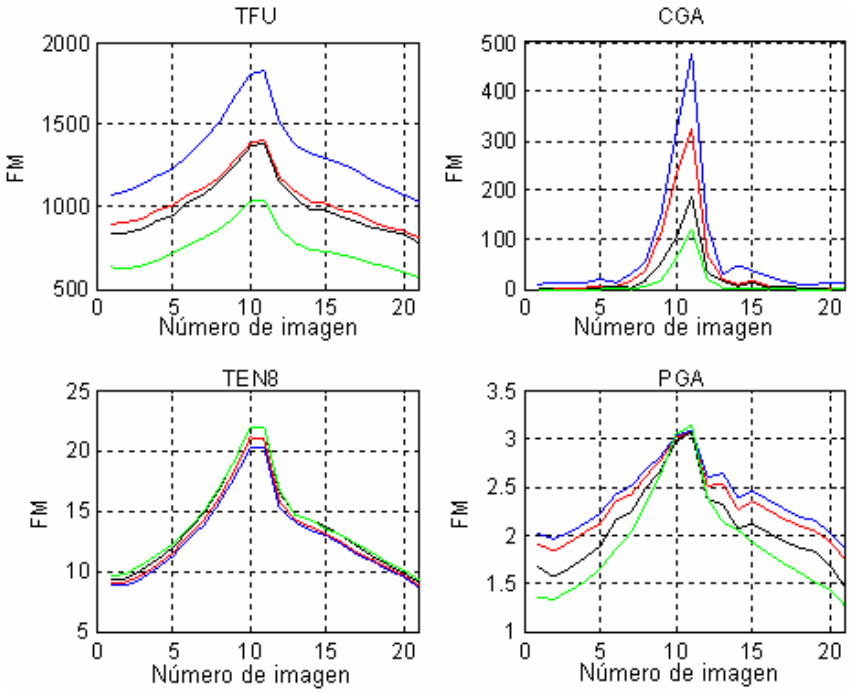


Figura 29. Aplicación de algoritmos de estimación de foco con diferentes áreas de medición. En azul, área del 80%; en rojo, área del 60%; en negro, área del 40% y en verde, área del 20%. **Fuente**: autores.

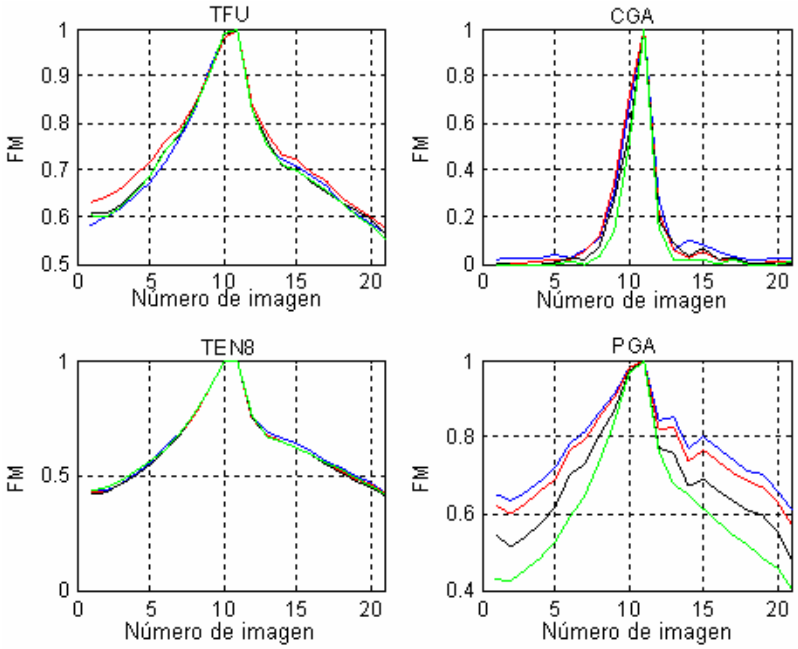


Figura 30. Resultados normalizados de aplicación de algoritmos de estimación de foco con diferentes áreas de medición. En azul, área del 80%; en rojo, área del 60%; en negro, área del 40% y en verde, área del 20%. **Fuente**: autores.

Calidad de la imagen

Como se describió con anterioridad, la función de estimación de foco se sometió a prueba con los grupos de imágenes G1 al G10, correspondientes a imágenes propias del sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico al que hace referencia este proyecto. También se hicieron pruebas con los grupos de imágenes del G11 al G25, que corresponden a imágenes de mejor calidad tomadas desde un sistema de captura prefabricado (sistema cámara – montura tipo C – microscopio). Los resultados de estas pruebas mostraron con claridad, como era de esperarse, que la función de estimación de foco funcionó con mayor efectividad con las imágenes de mayor calidad (grupos G11 al G25). La tabla 5 muestra los porcentajes de éxito, en la determinación de la imagen con mejor foco, para los cuatro algoritmos de mejor desempeño, aplicados a los diferentes grupos de imágenes.

ALGORTIMO	**Éxito (%)**	
	Grupos G1-G10	**Grupos G11-G25**
TFU	77.50	97.00
CGA	70.00	92.00
TEN8	70.00	100.0
PGA	72.50	95.00

Tabla 8. Porcentajes de efectividad de los cuatro algoritmos de mejor desempeño.

1.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1

Como resultado del trabajo de éste capítulo, fue posible la implementación de la función de medida de foco basada en el estudio de los diferentes algoritmos, logrando identificar los factores que inciden en el rendimiento y efectividad, en los que se incluyen la calidad de la imagen (su contraste e iluminación), la cantidad de información contenida en la misma, el plano de análisis de la imagen (para imágenes representadas en tres planos, R, G y B) y la presencia de partículas extrañas en planos focales distintos al de interés, siendo este último el de mayor incidencia.

Se experimentó con distintas técnicas la estimación del grado de enfoque de una imagen y cada una de ellas mostró sus características y ventajas propias. Así, los algoritmos basados en técnicas de diferenciación de imágenes con umbral (entre los cuáles CGA mostró ser el de mejor desempeño) mostraron tener una gran sensibilidad a cambios en el grado de enfoque de una imagen –lo cual se evidencia en funciones de medida de foco con mayor selectividad. Esta técnica agrupa algoritmos relativamente rápidos, aunque muestra problemas de desempeño con imágenes de poca información o poco contraste, lo cual no resulta recomendable para sistemas cuyo dispositivo de adquisición (cámara) tenga poco rango dinámico. El algoritmo PGA, basado en diferenciación de imágenes pero sin umbral, mostró un desempeño similar al de CGA pero, en general, con menor sensibilidad a cambios en la medida de foco y mayor efectividad en imágenes con poco contraste. De los algoritmos basados un técnicas de segmentación, aquellas modificaciones propuestas en este trabajo, TEN8 y VDG8, mostraron excelente efectividad en la mayoría de condiciones de imágenes. Estos últimos algoritmos se caracterizaron además por aportar funciones de medida de enfoque con curvas de gran suavidad (pocos máximos locales), aunque con altos tiempos de cómputo. Finalmente, el algoritmo TFU, basado en análisis en el dominio de la frecuencia, mostró excelente efectividad en la mayoría de condiciones, destacándose sobre los demás algoritmos en imágenes con partículas extrañas y suciedad en planos diferentes al de interés. Sin embargo, mostró los mayores tiempos de cómputo.

Aparte del algoritmo de estimación del grado de enfoque, otros factores como el área y plano de aplicación del algoritmo, mostraron afectar considerablemente los resultados en el enfoque automático; a pesar de que en la literatura sobre algoritmos de estimación de foco, poco se hace mención de estos factores. El área de aplicación del algoritmo sobre la imagen, aunque afecta de manera negativa –pero leve- la sensibilidad de los algoritmos a cambios en el grado de enfoque, puede mejorar considerablemente los tiempos de cómputo. En cuanto al plano de aplicación del algoritmo (rojo, verde o azul en imágenes RGB), el plano azul y el análisis de la versión en escala de grises

parecen los menos aconsejables para el tipo de imágenes tratadas en este trabajo. Los planos verde y rojo mostraron mejores resultados.

Contrastando algunos de los resultados del presente trabajo con otros del mismo tipo, se puede mencionar que en algunos casos, algoritmos como TEN y TFU son penalizados en cuanto a desempeño por sus altos costos computacionales [9], pero que en algunos trabajos, incluyendo éste, se destacan por sus rendimientos cualitativos [10]. Se corroboró también que los algoritmos basados en diferenciación de imágenes presentan el mayor rendimiento en cuanto a tiempo de cómputo [9,10,11].

El desarrollo de algoritmos para la estimación del grado de enfoque de una imagen es un trabajo que, si bien se rige por algunos principios generales, está altamente definido por la aplicación y el sistema en el cual se van a utilizar. Al comparar los resultados de trabajos en este aspecto con el nuestro y entre sí, es posible ver que los mismos algoritmos son clasificados de manera distinta en cuanto a su rendimiento dependiendo de la aplicación (como por ejemplo el tipo de microscopía para el cual son utilizados).

El algoritmo de búsqueda, el cual se expone en el capítulo siguiente, es el que determina las posiciones a las cuales se mueven la platina en el eje Z, para aplicar la función de estimación de foco a las imágenes observadas. El objetivo de este algoritmo de búsqueda es reducir los movimientos necesarios llegar a la posición con el mejor enfoque.

2. ALGORITMO DE BÚSQUEDA

Una vez analizados los algoritmos que permiten medir el grado de enfoque de una imagen, se describe a continuación el desarrollo de un procedimiento que permite determinar los movimientos del tornillo micrométrico (coordinados desde el PC a través de la interfaz electro-mecánica) necesarios para obtener de una manera rápida la imagen de mejor enfoque. El algoritmo se desarrolla para un sistema de adquisición de imágenes particular. En este sistema se busca realizar la adquisición automática de las imágenes de una muestra en el portaobjetos de un microscopio óptico. Para este sistema el algoritmo de búsqueda de foco, debe ser capaz de enfocar exitosamente la primera imagen y luego, a medida que se hace el barrido de la muestra, debe hacer pequeños ajustes para reenfocar la muestra (a medida que se hace el barrido las imágenes se desenfocan solo levemente). Por lo anterior, además del algoritmo de búsqueda, se propone una modificación más sencilla de éste que permite realizar el proceso de reenfoque.

Para este proyecto, el algoritmo de búsqueda es diseñado para cumplir con el objetivo de enfocar las muestras bajo las condiciones propias del sistema específico. De esta manera, la primera fase del desarrollo del algoritmo de búsqueda de foco consiste en un conjunto de pruebas que permitan identificar las condiciones bajo la cuáles éste debe funcionar. La segunda fase consiste en la descripción del algoritmo propuesto a partir de los resultados de la caracterización del sistema. La tercera fase, corresponde a las pruebas que se realizan al algoritmo de búsqueda del foco con el objetivo de determinar su desempeño. Este capítulo se divide en tres secciones que describen cada una de las fases anteriormente mencionadas.

2.1 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA

Para obtener los parámetros que permitieran definir una estrategia de búsqueda de la posición en la que se obtiene el mejor enfoque, se realizaron dos pruebas: la primera tuvo como objetivo determinar para cada uno de los objetivos del microscopio (3.5x, 10x, 25x y 40x) la amplitud de movimiento de la

platina, para la cual se aprecia un cambio en el grado de enfoque de la imagen captada por la cámara; la segunda prueba consistió en realizar un barrido moviendo el tornillo micrométrico en todo su rango, haciendo una adquisición equi-espaciada de imágenes. El barrido se hizo para diferentes muestras en distintas condiciones de iluminación, cantidad de tejido, presencia de suciedad, etc., en cada uno de los objetivos disponibles del microscopio. El propósito de estos barridos fue determinar el comportamiento de la función de medida de foco (ver capítulo 1). A continuación se describen los dos grupos de pruebas realizados.

2.1.1 SENSIBILIDAD AL DESPLAZAMIENTO

Para cada uno de los objetivos del microscopio, se obtiene una profundidad de campo (DOF) que depende del aumento del lente. Por esta razón, para cada aumento, la imagen observada tolera un rango distinto de la posición del lente respecto a la muestra antes de desenfocarse. Por lo tanto, la determinación de la sensibilidad del sistema al movimiento de la platina permitirá determinar la mínima amplitud en los movimientos que debe manejar el algoritmo de búsqueda de enfoque. Cabe resaltar que una imagen puede presentar cambios considerables desde el punto de vista de una función de medida de foco y no presentarlos, sin embargo, frente al ojo humano. Teniendo en cuenta la aplicación para la cual se desarrolla este sistema, es el ojo humano el criterio para definir este parámetro.

Para determinar la sensibilidad al desplazamiento, se procedió a enfocar manualmente una muestra. A partir del punto de enfoque, se realizó un desplazamiento controlado de la platina hasta notar un cambio en la imagen. Este procedimiento se repitió para diferentes muestras y para cada uno de los aumentos. La tabla 9 muestra los valores en pasos de motor para los cuales se observa un cambio en la imagen en cada aumento. A este parámetro de le denominó *unidad mínima de pasos* (UMP).

OBJETIVO	Distancia (pasos) -UMP-
3.5x	80
10x	25
25x	12
40x	5

Tabla 9. Sensibilidad del enfoque a desplazamientos de la platina.

2.1.2 COMPORTAMIENTO DE LA FUNCIÓN DE MEDIDA DEL GRADO DE ENFOQUE

Con el objetivo de definir un algoritmo de búsqueda efectivo para el sistema, fue necesario hacer un estudio del comportamiento de las funciones de estimación del grado de enfoque. Para ello se realizaron barridos haciendo capturas equi-espaciadas de imágenes y aplicando las funciones de estimación de foco a dichas imágenes. El espaciamiento (en número de pasos) entre las imágenes se definió de acuerdo a la tabla 9, según cada uno de los aumentos.

A manera de ejemplo, la figura 31 muestra los resultados de hacer el barrido para los objetivos de aumentos 3.5x, 10x, 25x y 40x para una misma muestra.

Al analizar los resultados de hacer el barrido en diferentes aumentos, se pueden destacar las siguientes características:

- A medida que se incrementa el aumento, disminuye la suavidad de la función de medida de foco. Es decir, aumenta el número de máximos falsos en la función de medida de enfoque.
- A medida que se incrementa el aumento, el pico correspondiente a la imagen de mejor foco se hace más estrecho –lo cual concuerda con el concepto de DOF.
- Finalmente, cuanto mayor es el aumento, menor es la sensibilidad del algoritmo a cambios en el grado de enfoque. Es decir, el rango de valores de la medida de foco se hace menor.

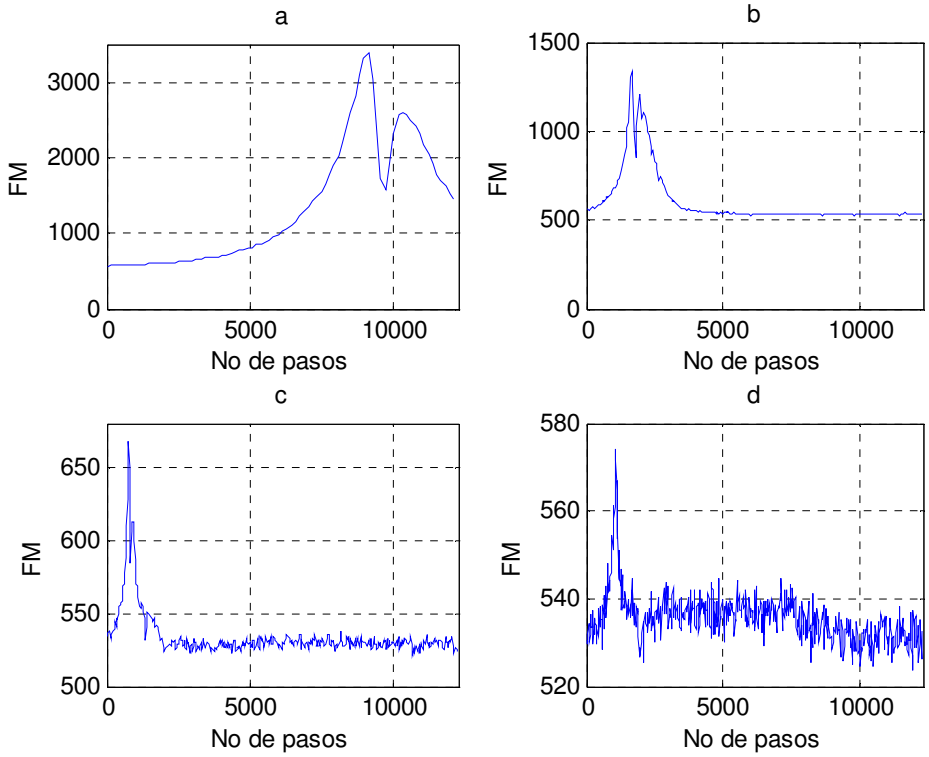


Figura 31. Función de medida de enfoque para barrido en diferentes aumentos. **a)** Aumento 3.5x, imágenes espaciadas 100 pasos. **b)** Aumento 10x, imágenes espaciadas 50 pasos. **c)** Aumento 25x, imágenes espaciadas 30 pasos. **d)** Aumento 40x, imágenes espaciadas 20 pasos. Para este ejemplo se empleo el algoritmo TFU. **Fuente**: autores.

Realizando pruebas bajo diferentes condiciones de la muestra (poco tejido, diferentes grados de iluminación, presencia de partículas extrañas), en los distintos aumentos, además de las ya mencionadas, se lograron observar ciertas características importantes en la forma de la función, que se describen a continuación.

Posición del foco

Para cada aumento, fue posible identificar que los puntos de enfoque están en posiciones aproximadamente constantes. Esto se cumple, sólo si se hace manipulación del tornillo micrométrico, dejando el macrométrico en una posición fija. Las figura 32, por ejemplo, muestra las funciones de medida de foco correspondientes a distintas muestras en aumento 3.5x. En esta figura es

posible observar que las distintas muestras exhibieron su mejor punto de enfoque entre 8300 y 8800 pasos respecto al punto cero de referencia. La tabla 10 muestra el rango de posiciones del foco, para los diferentes aumentos, de acuerdo con los resultados a pruebas realizadas varias muestras.

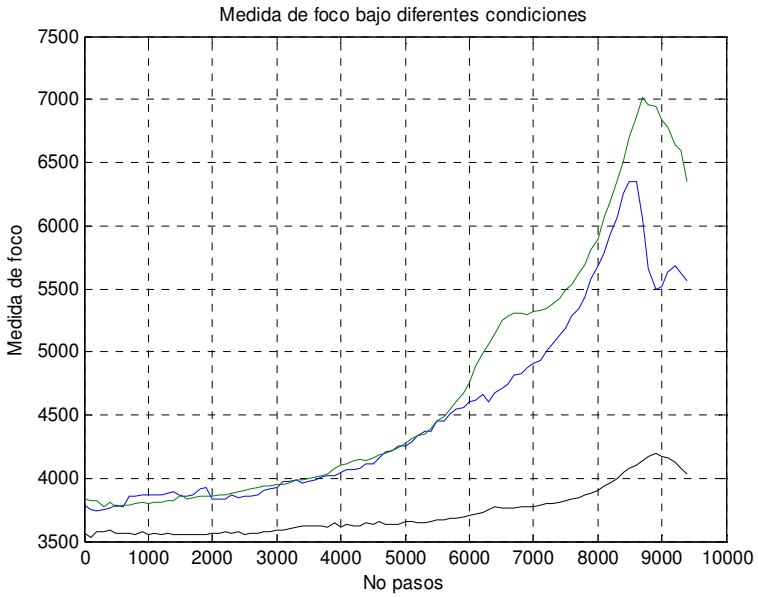


Figura 32. Funciones de medida de foco para diferentes muestras en aumento 3.5x. En azul imagen con buena cantidad de tejido. En negro, imagen con poca información. En verde, imagen con presencia de suciedad. **Fuente**: autores.

AUMENTO	Rango de enfoque Distancia (Pasos)
3.5x	8300-8800
10x	1860 -2940
25x	1460 -1940
40x	1310 -1800

Tabla 10. Posiciones de mejor foco para los diferentes aumentos.

Suciedad en la muestra

Así como la posición del máximo correspondiente a la imagen de interés enfocada se mantiene dentro de un rango, también se puede observar que el plano correspondiente a suciedad sobre la muestra, tiene una ubicación en un intervalo definido (figura 33).

Forma de la función

Independiente de la muestra observada, en general se puede destacar que la función de medida de foco presenta siempre una forma característica debido a diferentes efectos. La figura 33 resalta estas características para un barrido correspondiente a un aumento de 3.5x. Señalado en color naranja se observa un máximo local debido a la presencia de partículas extrañas localizadas en un plano diferente al de la muestra (suciedad); señalado en color azul se muestra el máximo global correspondiente al punto de mejor enfoque; finalmente, señalado en color rojo se muestra un comportamiento que se observó en todas las muestras: un máximo local correspondiente a una imagen desenfocada (independiente del algoritmo de medida del grado de enfoque empleado). Estos máximos se denominaron *max1*, *max2* y *max3*, respectivamente. Para los demás aumentos se presentan características similares, pero a medida que se incrementa el aumento es posible observar un cuarto máximo (*max4*), debido a la presencia de partículas extrañas presentes en un plano focal distinto. Este último máximo no es apreciable en aumentos inferiores pues se confunde con *max3*.

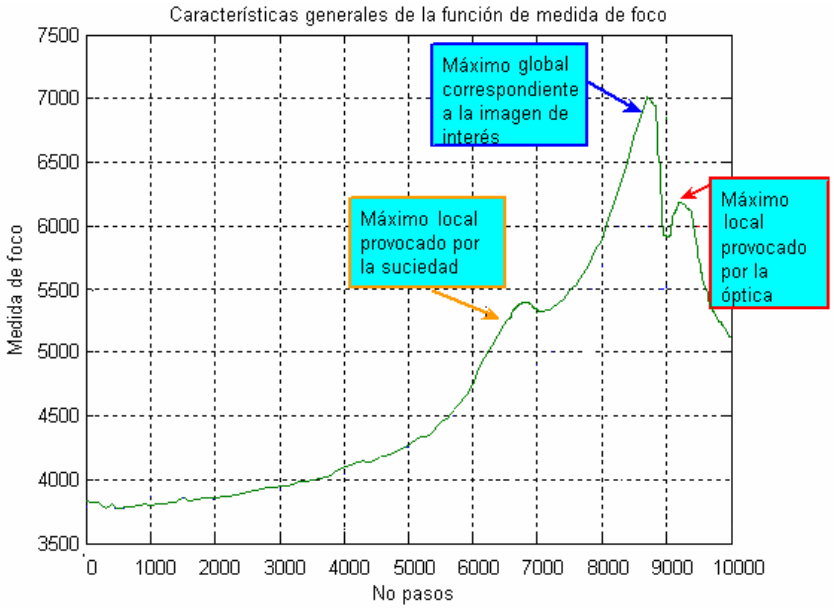


Figura 33. Características de la función de medida de foco para aumento de 3.5x. **Fuente**: autores.

Presencia de particulas de suciedad generan picos falsos, como los indicados en la grafica en color naranja. Con los ajustes establecidos, esta suciedad solo logra su punto de enfoque en el aumento de 3.5x

La imagen enfocada genera el máximo señalado en color azul
Este máximo supera los valores de los otros máximos locales

Un efecto debido a la óptica genera un falso máximo señalado en color rojo. Para aumento de 3.5x, este efecto se confunde con el plano de foco de particulas de suciedad (puntos negros en la imagen). Para otros aumentos, los picos son diferentes

Figura 34. Factores que determinan la presencia de máximos en la función de medida de enfoque **Fuente**: autores.

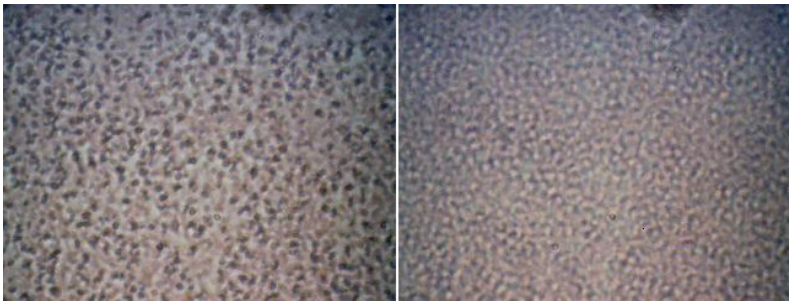


Figura 35. Efecto óptico causante de la aparición de máximos locales. A la izquierda la imagen en el plano de interés. A la derecha el efecto óptico. El pico generado por este efecto se señala en rojo en la figura 33. **Fuente**: autores.

Se pudo apreciar que, para cada aumento, la ubicación de los máximos *max1, max3 y max4*, se ubican a una distancia aproximadamente constante respecto al punto de mejor foco (*max2*). La figura 36 ilustra este fenómeno; la tabla 11 muestra el intervalo en el que se encontró *max2* para cada uno de los aumentos.

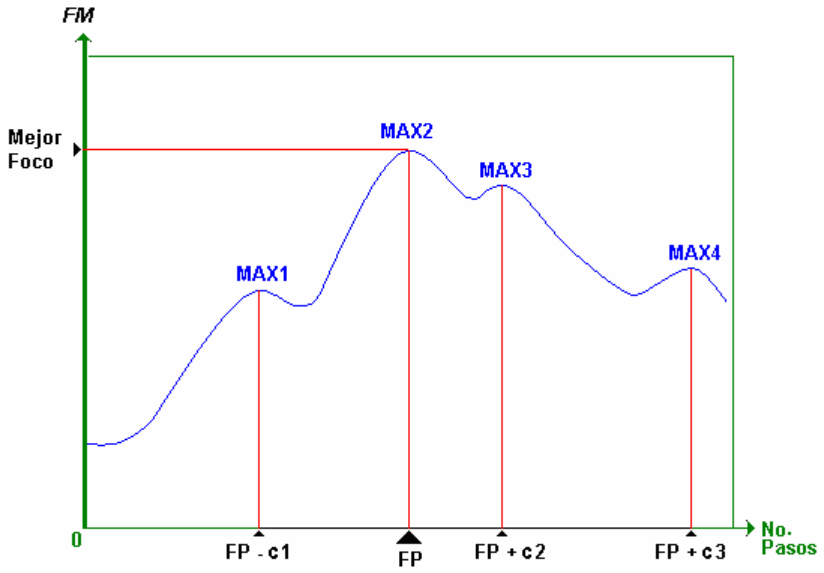


Figura 36. Ubicación de puntos singulares en función de medida de foco. **Fuente**: autores.

Aumento	Rango de FP	c1	c2	c3
3.5x	[8300 8800]	2000	1000	1000
10x	[1860 2940]	FR	300	450
25x	[1460 1940]	140	120	520
40x	[1310 1800]	FR	110	410

Tabla 11. Intervalos en los cuales se presentan los diferentes máximos en la función de medida de enfoque. La unidad de medida es pasos de motor. *FR* indica fuera del rango.

2.2 ALGORITMO PROPUESTO

2.2.1 BÚSQUEDA DEL PUNTO DE ENFOQUE.

Para este caso particular, se descartó el uso de métodos numéricos de optimización para la determinación del punto de mejor foco por las características de la función de medida de enfoque (en especial la falta de

monotonía y la presencia de múltiples máximos locales). Sin embargo, estas mismas características de la función de medida de enfoque permitieron definir un algoritmo de búsqueda que aprovecha que el punto de interés se encuentra en un rango definido de posiciones, para realizar la búsqueda dentro de dicho rango. De esta forma se evita la convergencia equivocadamente a los picos falsos provocados por la óptica y por suciedad.

Inicialmente, a partir de las características de las funciones de medida de enfoque observadas en la sección anterior, se procedió a dividir dicha función en tres regiones. La figura 37 ilustra este proceso para un aumento de 3.5x.

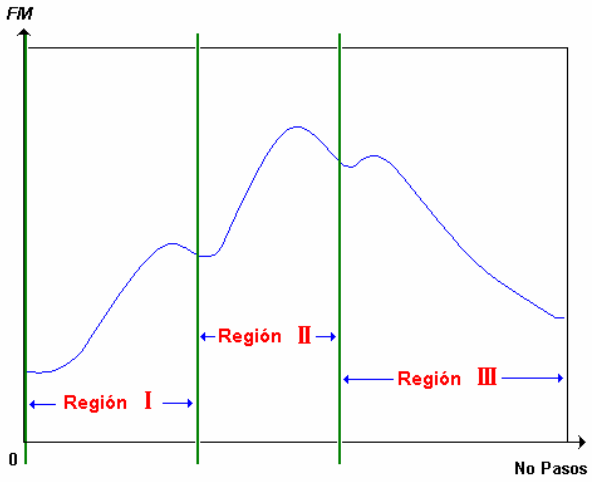


Figura 37. División de la función de medida de foco en regiones, para aumento de 3.5x. En la región I se ubica el plano correspondiente a suciedad sobre la muestra. En la región II se encuentra el punto de interés (mejor foco). En la región III se encuentran los máximos correspondientes a suciedad y al efecto propio de la óptica conjunta del microscopio y la cámara utilizada. **Fuente**: autores.

El algoritmo desarrollado se divide en dos fases: una búsqueda con una amplia resolución seguido de un barrido mas detallado. La búsqueda amplia inicia tomando tres puntos (X_0, X_1, X_2) en los cuales se realiza la captura y la medida del grado de foco (f_0 , f_1 ,f_2) de las imágenes obtenidas. Los puntos X_0, X_1 y X_2 se toman dentro la región II (región de interés) equiespaciados ***m*** pasos (ver

figura 38). Se debe asegurar que la primera posición (X_0) corresponda al mínimo valor de FP para cada aumento.

Mientras f_1 no sea la mayor medida de enfoque, se descarta el punto correspondiente a la menor medida entre f_0 y f_2, y se toma un nuevo punto en la dirección en la que aumenta la medida de enfoque. De esta manera, se espera que paulatinamente el algoritmo se acerque al punto de interés sin llegar a caer los máximos falsos cercanos, los cuales se encuentran en una posición posterior al máximo de la imagen de mejor enfoque.

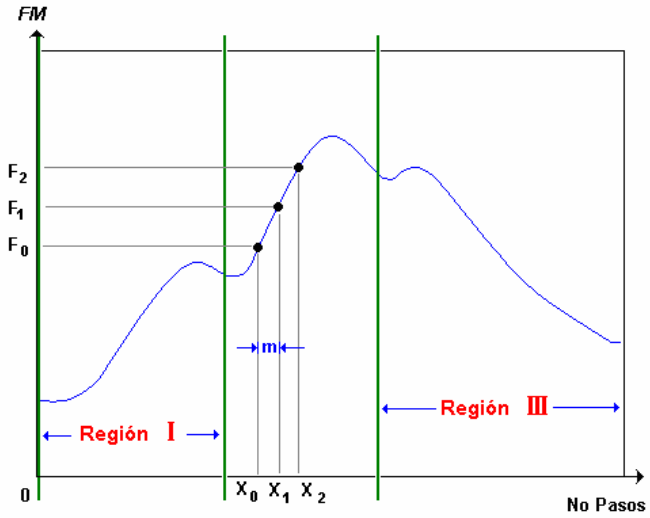


Figura 38. Toma de los tres primeros puntos en el algoritmo de búsqueda de foco. **Fuente**: autores.

Cuando se encuentra el patrón de concavidad ($f_1 > f_0$ & $f_1 > f_2$) inicia el escaneo pequeño, que consiste en tomar x imágenes alrededor del punto X_1, con un distanciamiento $n < m$ entre capturas. La imagen de mejor foco será la que en este último análisis obtenga una mayor medida de grado de enfoque. Los valores de m, n y x, dependen del aumento. m debe ser mayor (preferiblemente para rápida convergencia) que la UMP (ver tabla 1); y debe asegurar que el algoritmo de búsqueda no lleve al sistema a la región III. El valor de n debe ser menor a la UMP según la calidad de enfoque buscada. x dependerá de la sensibilidad de la función de medida de foco a cambios en el

grado de enfoque: entre mayor es el aumento, menor es la sensibilidad y por lo tanto debe seleccionarse un mayor valor de ***x***. La figura 19 muestra el diagrama de flujo de este algoritmo.

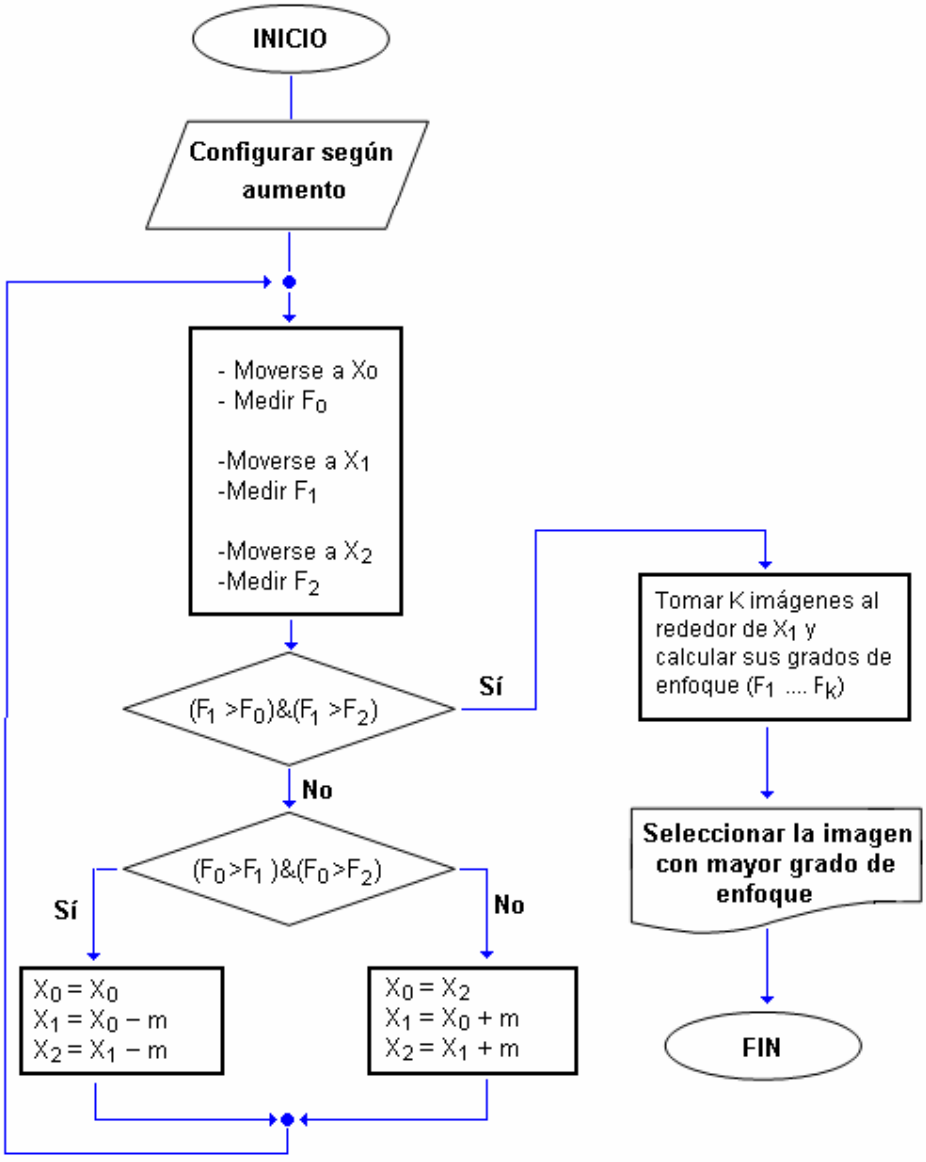


Figura 39. Diagrama de flujo de algoritmo de búsqueda de enfoque. **Fuente**: autores.

2.2.2 REENFOQUE

Una vez enfocada la primera imagen en el proceso de barrido sobre la muestra en el portaobjetos del microscopio, solo es necesario hacer pequeños reajustes

para enfocar las imágenes siguientes. Esto hace necesario desarrollar un algoritmo más rápido y sencillo que permite llevar a cabo este proceso.

El algoritmo propuesto con este fin, toma como referencia la posición de enfoque de la primera muestra enfocada, $\mathbf{X_1}$. Alrededor de este punto realiza un barrido equiespaciado adquiriendo imágenes y midiendo su grado de enfoque. Finalmente, la imagen con mayor grado de enfoque es guardada y su posición se toma como nuevo punto de referencia ($\mathbf{X_1}$). La figura 40 ilustra este procedimiento.

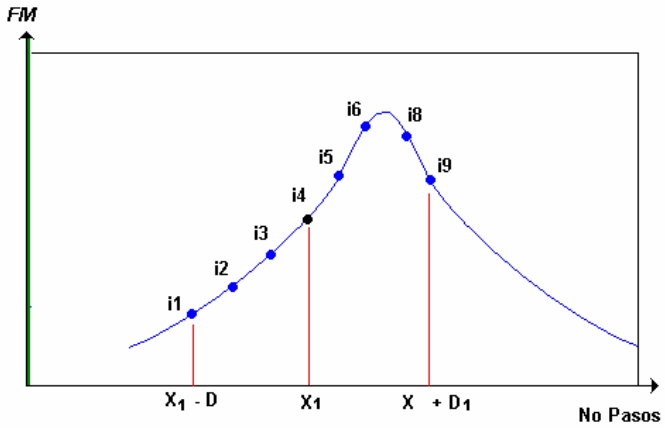


Figura 40. Algoritmo de reenfoque. **Fuente**: autores.

En la figura 40 se observa que son tomadas 9 imágenes equiespaciadas con posiciones centradas en $\mathbf{X_1}$ (El punto de enfoque de la muestra anterior). De todas ellas se selecciona la que presenta mayor medida del grado de enfoque y su posición será el nuevo valor de $\mathbf{X_1}$ para la siguiente muestra. Variables como el número de imágenes y el espaciamiento entre ellas vienen definidas por el aumento y la calidad del enfoque deseada.

Si a medida que se hace el barrido se presentan imágenes con poca o ninguna información de tejido, el algoritmo de reenfoque podría ir desviando la ubicación de $\mathbf{X_1}$, de manera que al reaparecer imágenes con información, no sería posible encontrar la imagen de mejor foco (Ésta estaría por fuera del intervalo $[X_1 - D, X_1 + D]$. Para evitar este problema, cuando $\mathbf{X_1}$ se ha tenido

una deriva desde su valor inicial al actual por encima de un límite **TH**, el sistema repite el algoritmo de búsqueda completo antes de seguir reenfocando. La figura 41 muestra un diagrama de flujo del algoritmo de reenfoque.

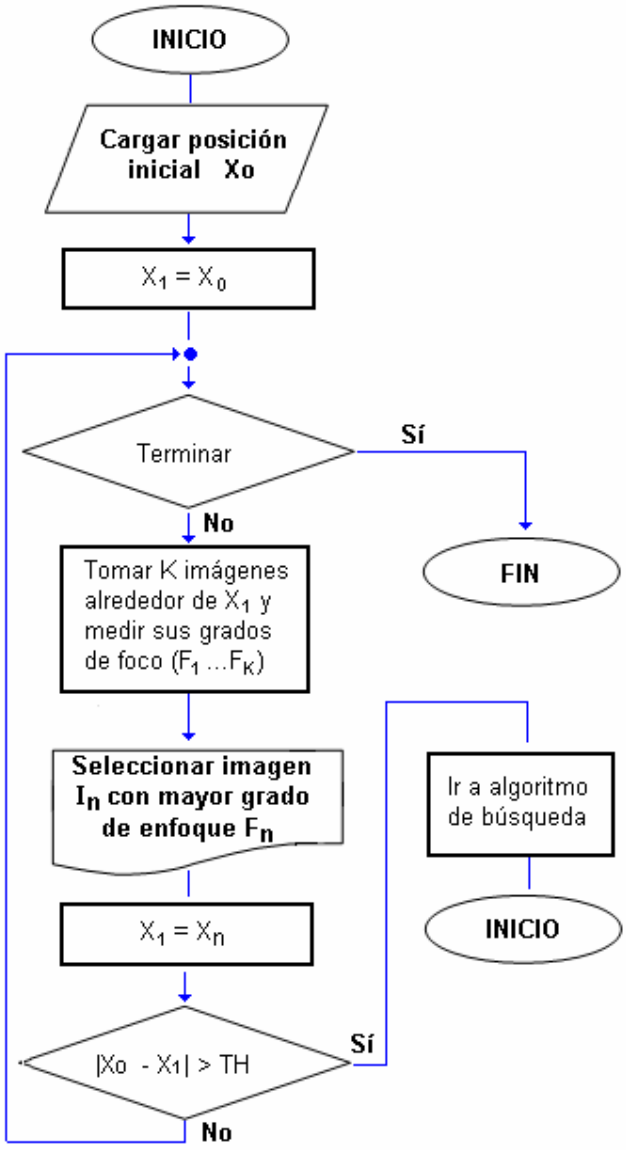


Figura 41. Diagrama de flujo de algoritmo de reenfoque. **Fuente**: autores.

2.3 PRUEBAS AL ALGORITMO DE BÚSQUEDA

2.3.1 BÚSQUEDA DEL PUNTO DE ENFOQUE

Con el objetivo de observar el desempeño del algoritmo de búsqueda propuesto se realizaron las pruebas en cada uno de los aumentos. Cabe

mencionar que el desempeño del algoritmo depende del algoritmo seleccionado al realizar las pruebas.

En lo concerniente a los tiempos de ejecución, en el aumento 3.5x el 77% del tiempo total para determinar el punto de mayor enfoque fue el empleado para posicionarse en la primera muestra (punto $\mathbf{X_1}$) . Esto debido a que en este aumento, se tiene mas alejado el intervalo de búsqueda (Region II) del punto de referencia cero. Caso contrario, para los aumentos mayores, el tiempo mas crítico se encontro en la segunda etapa del proceso, esto debido a que fue necesario realizar pausas en las adquisiciones para que la cámara pudiese actualizar la imagen. La tabla 12 muestra un resumen con los tiempos de computo para los demás aumentos para los métodos finalmente seleccionados en el capitulo anterior.

Algoritmo	**Aumento**			
	3.5x (TP=33.1)	**10x**(TP=6.92)	**25x**(TP=4.42)	**40x**(TP= 3.9)
TFU	TP + 9.5	TP + 6.8	TP +30.15	TP + 30.17
CGA	TP + 7.1	TP + 4.2	TP + 20.5	TP + 23.68
TEN8	TP + 7.3	TP + 4.7	TP + 21.6	TP + 24.9
PGA	TP + 6.2	TP + 4.4	TP + 20.28	TP + 23.67

Tabla 12. Tiempos de enfoque en los diferentes aumentos. TP: Tiempo para ubicarse en la posición de la primera muestra; tiempos en segundos. Equipo utilizado: Pentium IV a 1.8 GHz, 512MB RAM.

La efectividad del algoritmo esta determinada por dos parámetros fundamentales: el algoritmo de estimación del grado de enfoque, y el aumento.

Para probar la efectividad del algoritmo de búsqueda, se procedió a hacer pruebas de enfoque en cada aumento, con los cuatro algoritmos de mejor rendimiento (ver capítulo 1). En promedio, a cada algoritmo se le hicieron 100

pruebas de enfoque por cada aumento. En total se hicieron 400 ensayos, cuyos resultados de efectividad se muestran en la tabla 13. Las pruebas resumidas en la tabla 13 se hicieron sobre muestras con contenido considerable de información (tejido). Es decir, no se consideraron imágenes con cantidades insignificantes de información o vacías.

Algoritmo	Aumento			
	3.5X	**10X**	**25X**	**40X**
TFU	88%	85%	82%	54%
CGA	86%	82%	69%	50%
VDG8	87%	94%	60%	60%
PGA	88%	94%	43%	35%

Tabla 13. Efectividad del algoritmo de búsqueda para los diferentes algoritmos, según el aumento.

Es importante resaltar, que las muestras analizadas fueron sometidas bajo diferentes condiciones. De estas la que mayor efecto tuvo sobre la efectividad de el algoritmo de búsqueda fue la presencia de suciedad, que en algunos casos, puede considerarse una muestra no apta para un análisis posterior, ya que la posible información que esta posee, puede tomarse de una imagen adjunta con menor contenido de suciedad. Este efecto se logra corregir con el reenfoque que siempre se realiza a las imágenes adyacentes a la imagen capturada. Los resultados del proceso de reenfoque se muestran a continuación.

2.3.2 REENFOQUE

Para probar el algoritmo reenfoque se partió de una imagen enfocada. Luego se procedía a mover manualmente el portaobjetos del microscopio –para enfocar una nueva porción de la muestra- y se ejecutaba el algoritmo de reenfoque. Este procedimiento se llevó a cabo un promedio de 40 veces para

cada algoritmo, en los diferentes aumentos, para un total de 800 ensayos. Los resultados de efectividad para este experimento se muestran en la tabla 14.

Algoritmo	Aumento			
	3.5X	**10X**	**25X**	**40X**
TFU	100%	95%	98%	98%
PGA	100%	88%	82%	97%
VDG8	100%	92%	96%	98%
CGA	100%	86%	77%	8%

Tabla 14. Efectividad del proceso de ajuste del enfoque

2.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2

Se logró la implementación de un algoritmo que determinara la posición en la cual se obtiene la imagen con mayor grado de enfoque. El algoritmo se desarrolló para las características propias del sistema, las cuáles no se mostraron apropiadas para el desarrollo de un algoritmo de búsqueda basado en métodos numéricos ya que para estos casos se requiere la caracterización de algunos parámetros de la función de medida, tales como el rango o la forma forma característica que esta presenta (en general, ajustando a una parábola) [12] lo cual no fue posible en ésta aplicación. El método desarrollado es por lo tanto, una combinación con las modificaciones pertinentes, de otros métodos [12,17] basados en la búsqueda sucesiva en regiones de interés y búsqueda global (primera y segunda fase del algoritmo).

La determinación de la unidad mínima de pasos (UMP) a la cual debía moverse el sistema, para observar un cambio visual en el grado de enfoque de la imagen, permitió incrementar la efectividad de los algoritmos al determinar la mejor enfocada. De igual forma, la selección de un patrón de avance apropiado en la primera etapa del algoritmo, posibilitó evitar efecto indeseables en el proceso de enfoque (máximos locales, tiempos de enfoque largos).

En el proceso de reenfoque, los tiempos de posicionamiento son comparables con el tiempo de captura de la imagen y su medida de grado de enfoque. Ésto permite afirmar, que el sistema mecánico representa la mayor limitación en cuanto tiempo de cómputo, para la primera imagen.

En la siguiente sección, se describe el sistema de control de posición, el cual comprende los sistemas mecánico, eléctrico e interfaz de usuario, los cuales permiten la manipulación del microscopio desde el PC.

3. SISTEMA DE CONTROL DE POSICIÓN

El presente capítulo muestra en sus dos primeras secciones el desarrollo de los sistemas mecánico[15] y eléctrico adaptados al microscopio, con el fin de permitir su manipulación desde el computador por medio de la interfaz de usuario. La interfaz de usuario es descrita en la tercera sección de este capítulo.

3.1 SISTEMA MECÁNICO.

El microscopio óptico dispone para el movimiento de la platina de cuatro perillas. Dos de éstas, denominadas tornillo micrométrico y tornillo macrométrico, permiten el movimiento en el eje Z, el cual modifica el distanciamiento de la platina (sobre la cual se ubica la muestra a observar) respecto del objetivo (que determina el aumento). El resultado de este movimiento es el cambio en el grado de enfoque de la imagen observada en el ocular (o dispositivo de adquisición de imágenes adaptado). El tornillo macrométrico permite movimientos amplios por ángulo de giro, mientras que el tornillo micrométrico permite movimientos más refinados, que son los que permiten el ajuste final del enfoque. El presente trabajo está orientado a la manipulación únicamente del tornillo micrométrico. Por lo tanto, para el buen desempeño del sistema de adquisición desarrollado, el tornillo macrométrico deberá tener una posición fija.

El tornillo micrométrico del microscopio empleado en el presente trabajo posee una libertad de giro de 26 vueltas (9360 grados). Esta perilla fue acoplada con un motor paso a paso con resolución de 1.8 grados/paso de manera directa, por medio de una banda rígida. La relación entre los radios del eje del motor y del tornillo micrométrico permitió una resolución de giro de 0.945 grados/paso. Para mantener la distancia entre el motor y la perilla, el motor fue atornillado a la base del microscopio, la cual da soporte al microscopio y a la fuente de

[15] Planos y fotografías descriptivas del sistema mecánico se incluyen en el anexo C

iluminación del microscopio pero es una pieza independiente de éste, mediante una pequeña pieza en forma de L. La figura 42 muestra un esquema de la disposición de este acople.

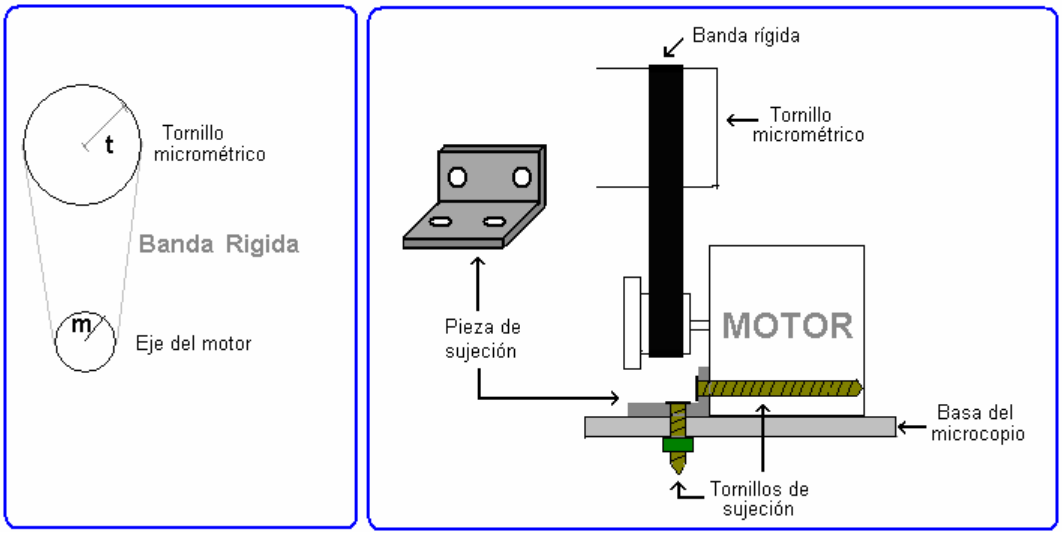


Figura 42. Disposición del acople entre la perilla del tornillo micrométrico y el motor que controla su movimiento.

Las otras dos perillas permiten el movimiento de la platina en los ejes X-Y. Al manipular estas perillas, se consigue observar en el ocular (o el dispositivo de adquisición de imágenes acoplado al microscopio) una sección diferente de la muestra a observar.

Para lograr establecer la forma de acoplar los motores a cada una de estas perillas, fue primero necesario determinar el área de visión que se obtiene en el dispositivo de adquisición* para el aumento mas grande, ya que este determinaría el desplazamiento mínimo necesario para observar una sección adyacente de la muestra observada.

El área de visión fue determinada para el aumento de 3.5x obteniendo valores de 830 µm x 625 µm (figura 43 a). Esto corresponde para el aumento de 40x a un área de visión de 72.625µm x 54.68µm. Las perillas cuyos diámetros son

de 10.8mm y 14.8mm tiene un desplazamiento de 34mm/revolución y 18mm/revolución en los ejes X y Y respectivamente.

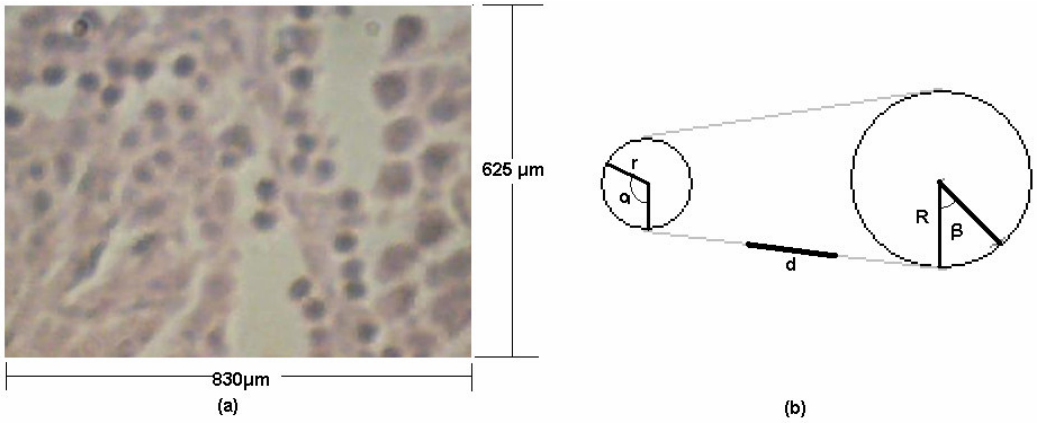


Figura 43 a) Área de visión para el aumento de 3.5x. **b)** Disposición de un sistema de transmisión por medio de banda rígida. R representa el radio de las perillas, y r el radio de los motores. **Fuente**: autores.

Dado que la resolución de avance de los motores X, Y es respectivamente de 1.8°/paso y 3.6°/paso, se requiere de un sistema reductor con relaciones de 2:1 para X y 6:1 para Y. Este criterio permite seleccionar las dimensiones de las poleas que acoplan los motores con los tornillos del microscopio. Dado que el radio del eje del motor Y es de 12mm, se necesitaría un radio de 72mm para el tornillo del microscopio. Esto impide la aplicación de un acople directo (como el de la figura 43b) y se hace necesario un sistema de doble reducción (como el ilustrado en la figura 44).

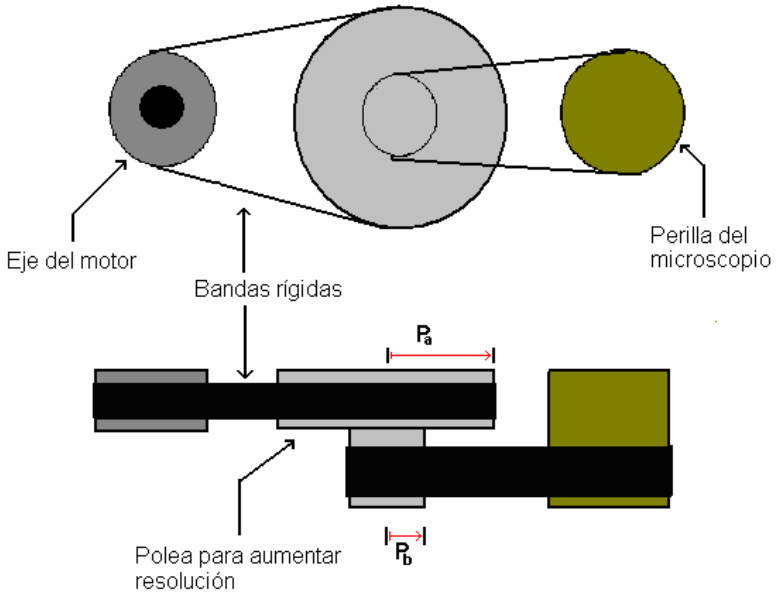


Figura 44. Acople realizado entre los motores y las perillas que permiten los movimientos en el eje X-Y de la platina del microscopio. **Fuente**: autores.

La disposición mecánica de las perillas en el microscopio es tal que las perillas están acopladas a un mismo eje, una debajo de la otra. La perilla que permite los movimientos en el eje X, realiza el movimiento sobre el porta objetos, mientras que la perilla del eje Y realiza el movimiento sobre la platina misma. Por esta última razón, al maniobrar una de las perillas, el conjunto completo de perillas y platina realizan un movimiento en conjunto como una sola pieza (fig 45a). Por lo tanto, la ubicación de los motores en la disposición mencionada anteriormente debía ser tal, que la posición entre los motores y las perillas fuese siempre constante. De esta manera sería necesario adaptar los motores a la platina del microscopio. La forma propuesta para cumplir con este objetivo en la elaboración de un conjunto de láminas adaptada en una de las esquinas de la platina, para que esta de soporte a los motores y las poleas de la forma en que se ilustra en la figura 45b, y finalmente obtener la disposición mostrada en la figura 46.

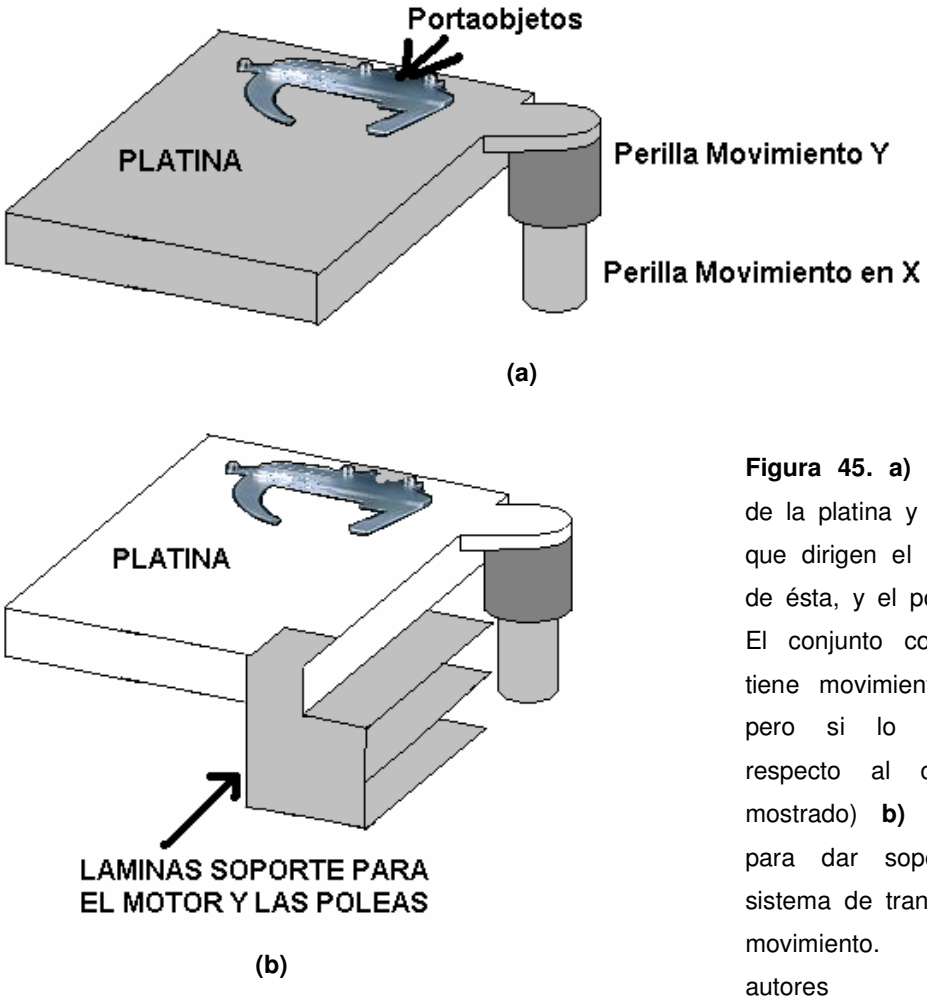


Figura 45. a) Disposición de la platina y las perillas que dirigen el movimiento de ésta, y el portaobjetos. El conjunto completo no tiene movimiento relativo, pero si lo tiene con respecto al ocular (no mostrado) **b)** Adaptación para dar soporte a el sistema de transmisión de movimiento. **Fuente**: autores

.

Al construir la estructura diseñada, con los acoples respectivos, se logran las resoluciones mostradas en la tabla 15.

	Eje x	**Eje Y**
Resolución (µm/paso)	23	52

Tabla 15. Resolución obtenida en cada uno de los ejes.

Figura 46. Disposición de los motores para transmitir los movimientos en los ejes X-Y de la platina del microscopio. **Fuente**: autores.

3.2 SISTEMA ELÉCTRICO

En este capítulo se expone el diseño y desarrollo de una interfaz electrónica para permitir el control de un sistema de motores paso a paso, a través del puerto paralelo del computador, desde PC.

En la primera parte de este informe se expone el proceso de diseño y selección de componentes para la interfaz. En la segunda parte se expone el desarrollo del circuito diseñado para el control de los motores. La tercera parte expone los resultados de probar la interfaz desarrollada, efectuando un control del movimiento de los motores desde el PC.

3.2.1 DISEÑO Y SELECCIÓN DE COMPONENTES

3.2.1.1. Requerimientos del sistema

En esta parte del informe se exponen las características con las cuales se diseñó la interfaz electrónica con el fin de cumplir a cabalidad el objetivo para el cual es diseñada: permitir el control desde el PC, mediante el puerto paralelo, del sistema de motores que accionan la parte mecánica del *sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico*.

Modo de avance: Según el proceso de selección de los motores y el desarrollo del sistema mecánico al que éstos irán acoplados (revisar *Sistema mecánico*

en este documento), la interfaz permite el avance de los motores en pasos sencillos. Para el caso de los motores que accionarán el movimiento en las direcciones X e Y del sistema, es necesario que el avance a paso sencillo se lleve a cabo energizando dos bobinas al tiempo para lograr una mayor transmisión de torque a los motores.

Velocidad de control

La velocidad máxima a la cual la interfaz es capaz de controlar los motores paso a paso viene limitada por el sistema mecánico al cual éstos se acoplan y por la velocidad a la cual es posible transmitir datos al puerto paralelo desde PC. Respecto a esto último, pruebas realizadas muestran una fuerte dependencia de la velocidad de transmisión en el equipo de cómputo utilizado. La tabla 16 muestra las velocidades de transmisión medidas experimentalmente para diferentes equipos de cómputo.

Descripción del equipo	**Velocidad de transmisión (bits/segundo)**
Pentium III 850MHz, 256Mb RAM, Tarjeta Intel.	11 bits/segundo
Pentium III 1.1 GHz, 256Mb RAM, Tarjeta Intel.	84 bits/segundo
Pentium IV 3.06 GHz, 512Mb RAM, Tarjeta Intel.	420 bits/segundo

Tabla 16. Velocidades de transmisión de datos desde PC al puerto paralelo para diferentes equipos de cómputo. La velocidad mostrada corresponde a la velocidad máxima a la cual el sistema es capaz de enviar una transición de alto a bajo repetitivamente. La velocidad de transmisión real, corresponde entonces, al doble del valor mostrado en la tabla.

Comunicación con el PC

La interfaz electrónica se diseñó para permitir el control de los tres motores a partir de un número de pines que no excedieran el número de bits de salida

que se pueden establecer en el puerto paralelo. De los 12 pines de los que se dispone el puerto paralelo configurables como salida, son suficientes para controlar tres motores bipolares de dos fases. Sin embargo, si se desea crear un sistema flexible y que permita futuras expansiones, es posible limitar los bits de control a 8 y dejar que los cuatro restantes se utilicen en sistemas de multiplexado para el manejo de varios sistemas de motores desde el PC. Así, se desarrollo la interfaz de manera que permitiera el control de los motores solo con 8 señales digitales de control (1 byte). Esto posibilita que la comunicación pueda, a futuro, cambiarse con facilidad a protocolo RS232 (tan solo añadiendo una etapa adicional a la entrada que convierta de serial a paralelo). Además, con el uso de solo 8 bits para controlar los motores, se dispone de los 8 restantes para el monitoreo del sistema.

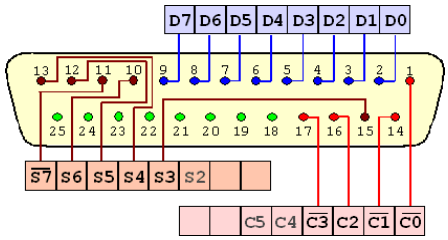


Figura 47. Pines del puerto paralelo. C0-C3, pines in/out; D0-D7, pines in/out; S3-S7, pines de salida.

3.2.1.2 Criterios de diseño

A continuación se definen los principales criterios que se tuvieron en cuenta al momento de diseñar la interfaz para manejar los motores mediante puerto paralelo. La definición de estos criterios de diseño tiene en cuenta la labor del ingeniero que busca reducir al máximo la utilización de recursos materiales e intelectuales, al tiempo que se busca obtener los mejores resultados en cuanto a confiabilidad, rendimiento y desempeño.

Consumo de Potencia: Aunque la aplicación no demanda reducir los consumos para buscar autonomía –es decir, no hay equipos portátiles que requieran consumo muy reducido de potencia- o para reducir exceso de calentamiento, siempre es importante para el ingeniero cuidar la eficiencia de los sistemas

desarrollados. De una forma u otra, es de esperarse que el mayor consumo de potencia en el sistema se presente en los motores que se van a accionar. Sin embargo, dado que la interfaz de control será la encargada de suministrar la potencia a dichos motores, debe tenerse especial cuidado en el diseño de la alimentación de los motores para conseguir la mayor eficiencia.

Tamaño: Dado que se pretende utilizar el sistema en aplicaciones de laboratorio clínico, es importante que la interfaz no represente incomodidad para los usuarios del sistema. Se debe mantener el tamaño dentro de los límites apropiados, al igual que se debe cuidar la apariencia estética del sistema.

Costo: Para este caso, el costo es uno de los principales criterios de diseño en el sistema. La interfaz debe poderse implementar tratando de reducir el máximo los costos por dispositivos utilizados, dificultades técnicas del montaje y mantenimiento.

Mantenimiento: Este es otro criterio de mucha importancia para el sistema que se busca desarrollar. Debe garantizarse, no solo la confiabilidad del sistema, sino que se debe reducir la complejidad del mismo al máximo para facilitar posibles trabajos de mantenimiento correctivo.

Reproducibilidad: Dado que este trabajo debe servir de base y apoyo para posteriores avances en el proceso de automatización de microscopios (y otros dispositivos), deben diseñarse circuitos con la mayor facilidad de reproducción.

3.2.1.3. Diseño de la interfaz de control

El diseño de la interfaz para el control de motores paso a paso desde el puerto paralelo, puede dividirse en tres partes principales (figura 48) que serán descritas a continuación.

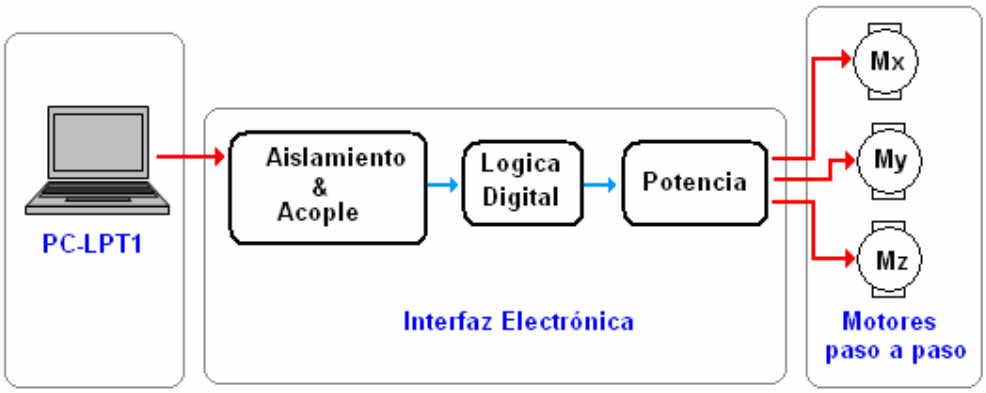


Figura 48. Esquema de interfaz para control de motores paso a paso desde puerto paralelo. **Fuente**: autores.

3.2.1.4 Etapa de Aislamiento y acople.

Con el fin de brindar protección del computador. del resto del circuito, para el aislamiento se seleccionó el integrado ADUM2400 de *Analog Devices*, que se trata de un aislador digital de 4 canales que combina tecnología CMOS con tecnología de micro-transformadores de núcleo de aire. Este producto es relativamente nuevo en el mercado y presenta varias ventajas al ser usado en la interfaz para el control de los motores: sustituye convenientemente el uso de opto acopladores sin complicar el diseño con dispositivos adicionales (resistencias), no linealidades, ni efectos por temperatura; Puede funcionar con un consumo de potencia bastante inferior a los opto acopladores. Además, el ADUM2400 provee un aislamiento independiente de sus dos canales permitiendo desacoplar la tierra del puerto paralelo de la del circuito evitando problemas de ruido.

3.2.1.5 Etapa de lógica digital.

Esta etapa es la encargada de tomar las señales generadas en el puerto paralelo, y transmitidas a través de la etapa de aislamiento y acople, para producir las señales de excitación para las bobinas de los motores paso a paso.

Para la construcción de esta etapa se consideraron dos opciones de mayor factibilidad: utilizar un microcontrolador o utilizar lógica discreta. Para decidir cuál de las dos opciones resultaba más conveniente, se elaboró la tabla17, donde se califica cada opción según los criterios expuestos en la sección anterior de este capítulo.

Para seleccionar el microcontrolador con el cual se hizo el análisis comparativo se tuvo en cuenta que éste debía disponer de por lo menos 5 pines de entrada (si se utiliza un *Demux* sabiendo que solo los motores XY deben poder funcionar de manera simultánea) y 9 pines de salida (nuevamente considerando usar un *Demux*), sin necesidad de temporizadores ni conversores.

Luego de decidir el uso de compuertas lógicas para el diseño y construcción de la interfaz para el control de los motores paso a paso, se procedió a seleccionar la configuración que permitiera el control de un motor a partir de dos señales de control: CLK que indica cada paso del motor y DIR que indica la dirección del movimiento. La figura 49 muestra la topología seleccionada.

	Controlador PIC16F84A-04P	**Compuertas Lógicas**
Tamaño (10%)	Permite diseño compacto con reducción del tamaño. Independiente de la complejidad de la lógica. **(5.0)**	Incrementan el tamaño del circuito impreso. Depende de la complejidad de la lógica necesaria. **(3.0)**
Potencia (15%)	Menor consumo de potencia **(5.0)**	Un mayor número de dispositivos implica mayor consumo **(3.0)**
Costo (20%)	La necesidad de circuitos para la programación implica mayores costos **(3.0)**	No requiere dispositivos adicionales de programación, pero incrementa el numero de dispositivos **(3.0)**
Mantenimiento (20%)	Requiere reemplazo total. El reemplazo debe ser programado. No permite monitoreo de las señales de control. Es una "caja negra". **(2.0)**	Solo requiere reemplazo de partes dañadas. Permite monitorear señales de control para detectar fallas. **(4.0)**
Reproducibilidad (20%)	Se requiere interfaz para programación, además del programa. **(2.0)**	Directa. Solo copiar el montaje. **(5.0)**
Simplicidad (15%)	Mayor complejidad sensibilidad a ruido **(2.0)**	Menor complejidad y tiempo de desarrollo **(4.0)**
TOTAL	**2.95**	**3.75**

Tabla 17. Comparación cuantitativa entre el diseño con microcontrolador y el diseño con compuertas lógicas.

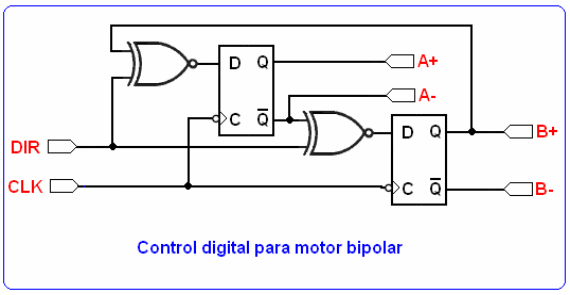


Figura 49. Lógica digital para el control de un motor. CLK y DIR son las señales de control. A+, A-, B+ y B- representan las terminales de las bobinas de un motor bipolar. Este circuito permite avance a paso sencillo, en ambas direcciones, energizando dos bobinas del motor al mismo tiempo. **Fuente**: autores.

3.2.1.6 Etapa de potencia.

Se encarga de tomar las señales de la etapa anterior para inyectar suficiente corriente en las bobinas del motor para el funcionamiento apropiado de éste. La tabla 18 muestra los valores de tensión de alimentación, corriente y potencia para cada motor, para una tensión de alimentación de 6 V.

MOTOR	Corriente (mA)	Potencia (W)
Eje X	600	3.6
Eje Y	923	5.5
Eje Z	600	3.6

Tabla 18. Datos de alimentación y consumo de potencia de los motores del sistema.

Para la etapa de potencia se selecciona el integrado L293D de *texas instruments*, el cual cuenta con dos puentes H con diodos de protección, donde cada canal soporta hasta 600mA (con un pico máximo de 1.2A), y permite alimentar los motores entre 4.5 y 36V. La conexión se de los motores se hace teniendo en cuenta las indicaciones del hoja de datos del dispositivo [21]

3.2.2 CONSTRUCCIÓN DEL PROTOTIPO

3.2.2.1 PCB

En la elaboración de circuitos impresos para controles de motores eléctricos, algunas de las principales preocupaciones del diseñador son: el manejo del

ruido[16] producido por las corrientes cambiantes en los motores y la disipación de calor para evitar sobrecalentamiento de los circuitos impresos.

En cuanto al manejo del ruido por inducción electromagnética, se siguieron algunas de las recomendaciones encontradas en la literatura [20] para la minimización de estos efectos.

Respecto a la disipación de calor, se siguen las indicaciones de la hoja de datos del integrado L293D [21]. En contacto con este integrado se deja un área de cobre apropiada para la potencia que va manejar el integrado.

3.3. INTERFAZ DE USUARIO

En esta sección se expone la manera en que se acopló el trabajo mostrado en las secciones y capítulos anteriores, para finalmente constituir el *sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico*.

Dado que el propósito del sistema es ser usado en la revisión de muestras microscópicas en laboratorios de patología, fue necesario idear el mecanismo para permitir actuar al sistema de acuerdo a los requerimientos del usuario de una manera fácil y rápida. De tal forma, el sistema puede considerarse como un todo articulado y no como un conjunto de partes de difícil manejo y acople.

La interfaz se desarrolló con programación orientada a objetos (interfaz gráfica) que permite al usuario disponer de todas las utilidades del sistema desde un ambiente amigable y versátil. A continuación se enuncian algunas de las acciones que el usuario puede llevar a cabo desde dicha interfaz. Para mayor profundidad sobre esta interfaz, su uso y funcionamiento, referirse al anexo B: *guía para el usuario de la herramienta AScope v1.0*.

---

[16] En un sentido mas estricto, aquí no se hace referencia a ruido sino a interferencia electromagnética. El ruido y la interferencia son fenómenos indeseables en un circuito pero de causas y naturalezas distintas

- La interfaz permite al usuario llevar a cabo un proceso de adquisición de imágenes automático a partir de unos pocos parámetros y ajustes iniciales: se indican elementos como el área total que se va a adquirir, el aumento a utilizar y se ajustan las condiciones iniciales de posición y luz en el microscopio. Cuando el usuario los desee, el sistema inicia el proceso de adquisición haciendo un barrido sobre el área indicada.
- Es posible almacenar las imágenes en diferentes formatos gráficos. A través de la interfaz el usuario le indica al sistema el directorio, dentro del PC, donde desea almacenar las imágenes capturadas durante la adquisición.
- La interfaz permite al usuario elegir entre diferentes patrones para llevar a cabo el barrido sobre la muestra.

Una vez acoplados los elementos desarrollados para constituir el *sistema de adquisición automática de imágenes para microcopio óptico*, se procedió a probar. Para esto, se procedió a realizar un conjunto de adquisiciones automáticas. La metodología seguida consistió en ajustar manualmente parámetros de luz y posicionamiento de la muestra en el portaobjetos del microscopio; se le indicaban al sistema los parámetros requeridos por éste (aumento a utilizar, calidad de enfoque y área de adquisición) y se le indicaba al sistema que efectuara la adquisición. Este procedimiento se repitió varias veces para distintas muestras, cambiando los aumentos, área de adquisición y la calidad del enfoque. También se sometió a prueba las demás utilidades que la herramienta dispone, como el almacenamiento y visualización de imágenes previamente almacenadas. Los resultados fueron exitosos.

3.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO 3

Se construyeron los sistemas mecánico y electrónico que permitieron el control del conjunto de motores paso a paso desde el PC, a través del puerto paralelo. Los sistemas se desarrollaron aplicando criterios de diseño que consideraron la reducción de costos, simplificad del diseño, tamaño y el consumo de potencia, logrando ajustarse con los para su uso en esta aplicación.

Como complemento a los resultados, el desarrollo resultó adecuado, ya que en algunos casos, la misma velocidad del sistema impidió la captura adecuada de las imágenes.

El componente software del sistema, por medio de la interfaz desarrollada, permite al usuario definir los parámetros iniciales con los cuáles inicia la adquisición. Ésta interfaz, tiene una presentación amigable, lo cual permite una interacción fácil y rápida.

4. CONCLUSIONES GENERALES

Al llevar a cabo este proyecto logró la construcción de un sistema que permite el control, desde un computador, de los movimientos de los ejes X, Y y Z de la platina de un microcopio óptico respecto a su ocular. Ésto permitió su utilización para la automatización de los movimientos del microscopio, para llevar a cabo un barrido de la muestra en el portaobjetos.

Mediante la cámara Web acoplada al microscopio, se permitió la adquisición de las imágenes captadas a través del ocular, para que en PC pudieran ser procesadas por los algoritmos de medición del grado de enfoque, y finalmente, si el usuario lo desea, las pueda almacenar de forma permanente en el PC.

Se llevó a cabo un estudio sobre distintas técnicas y algoritmos para la estimación del grado relativo de enfoque de una imagen. Este estudió permitió la comprensión de las técnicas, además de la proposición de modificaciones a algoritmos, las cuales permitieron obtener mejores resultados en cuanto a tiempo de cómputo y efectividad. A partir de los algoritmos estudiados, entre los que se destacaron CGA, TFU, TEN8 y VDG8, se desarrolló una función para estimar el grado de enfoque de imágenes. Este trabajo mostró que fue posible desarrollar algoritmos efectivos para determinar el grado de enfoque de imágenes en microscopía óptica bajo las condiciones que la aplicación particular demanda.

Se desarrolló un algoritmo para la búsqueda del punto de enfoque para microscopio óptico, el cuál se elaboró con base en la caracterización propia del sistema. El algoritmo coordina los movimientos necesarios de la platina, en dirección del eje Z, para lograr enfocar y capturar la imagen observada a través del ocular de una manera rápida y efectiva.

Se desarrolló una interfaz de usuario, la cual integra los diferentes procedimientos que componen el sistema tales como el enfoque, captura de la

imágenes, barrido de la muestra y el almacenamiento de imágenes. Por medio de ésta interfaz, se permite definir un proceso de adquisición autónomo de una manera fácil y amigable. De esta manera, se espera un mejoramiento en los procesos de observación de muestras para su posterior análisis.

Con el desarrollo de los sistemas anteriormente mencionados, se dan por cumplido los objetivos planteados al iniciar este proyecto. Se espera que éste, pueda representar un componente complementario al desarrollo de otros proyectos desarrollados en la Universidad Industrial de Santander, orientados al procesamiento de imágenes de microscopía óptica con fines clínicos, científicos y académicos.

5. RECOMENDACIONES

El sistema desarrollado demostró efectividad en los resultados a pesar de sus limitaciones técnicas, bajo costo y simplificad en su diseño, Por lo tanto, no se descarta la búsqueda de mejoras en busca de incrementar su desempeño. Estas mejoras están orientadas principalmente al mejoramiento del sistema mecánico.

El desarrollo de otras técnicas en las cuáles se puedan determinar otros parámetros en las imágenes capturadas, pueden representar creación de nuevas técnicas o un mejoramiento de las técnicas estudiadas en este proyecto. Estas pueden estar orientadas principalmente a la detección y eliminación de partículas extrañas. En este proyecto se realizaron pruebas experimentales con base en métodos como la segmentación, eliminación y promediado de píxeles, con resultados favorables en algunos métodos.

El desarrollo de método para mejorar la visualización de las imágenes, podría realizarse por medio de la reconstrucción de las partes adquiridas. Pruebas de este tipo fueron realizadas con imágenes adquiridas con microscopio Olympus, empleando métodos basados en correlación de imágenes. Sin embargo, dadas las diferentes características en el sistema de iluminación del microscopio objeto de este trabajo, los resultados obtenidos no fueron igualmente exitosos. Para esto, se recomienda el trabajo en otros formatos de representación menos sensibles a la iluminación como el HSV.

REFERENCIAS

[1] MOLINA, R. *Introducción al procesamiento y análisis de imágenes digitales.* Departamento de ciencias de la computación e I. A. Universidad de Granada. 1998.

[2] GONZALES, Rafael; WOODS, Richard. *Digital Image Processing*. Editorial Prentice Hall, 2ª ed. New Jersey. 2002.

[3] DOUGHERTY, Edgard; GIARDINA, Charles. *Matrix structured image processing* Prentice Hall. Estados Unidos. 1987.

[4] RUSS, John. *The image processing handbook*. IEEE press. 3ra edición. Estados Unidos 1999.

[5] WATKINS, Christopher; SADUN, Alberto; MARENKA, Stephen. *Modern image processing: warping, morphing and classical techniques.* Academic press professional. Londres, 1993.

[6] OPPENHEIM, Alan. SCHAFFER, Ronald. *Tratamiento de señales en tiempo discreto*. Prentice Hall 2ª Ed. Madrid 2003. Secciones 4.8 y 6.6.

[7] ROSS, Sheldom. *Probabilidad y estadística para ingenieros.* Mc Graw Hill, 2ª edición. México, 2000.

[8] MONTGOMERY, Douglas; RUNGER, George. *Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería.* Mc Graw Hill, 1ª edición. México, 1994.

[9] SANTOS, A; ORTIZ, C. *Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis* (1997). The Royal Microscopical Society, journal of microscopy. 188, 264-272.

[10] NG Kuang; POO, Neow. *Practical issues in píxel-based autofocusing for machine vision*. 2001 IEEE Internacional Conference on Robotics an Automation. 2791-2796

[11] LEE, Je-Ho; KIM, Kun-Sop; NAM, Byung-Deok; LEE, Jae-Chon; KWON, Yong-Moo; KIM, Hyoung-Gon. *Implementation of a passive automatic focusing algorithm for digital still camera*. June 1995.

[12] PECH, J; CRISTOBAL, G; CHAMORRO, J; FERNANDEZ, J. *Diatom autofocusing in brightfield microscopy: a comparative study.* 2000.

[13] SUBBARAO, Murali. TYAN, Jenn-Kwei. *Selecting the optimal focus measure for autofocusing and depth*. IEEE transaction on pattern analisys and machine intelligence. Vol. 20, No.8. 1988.

[14] LI, Qi-Xiang. HEBERT, Jacques. *Automation of the microscope a scheme for improving the microscope.* IEEE Engeneering & Biology society. 1988.

[15] BRAVO, Miguel. PRICE, Jeffrey. *Method for the focal plane determination of microscopic objects.* Proccedings of XIV international conference on electronics, communication and computers. 2004.

[16] HUGHLETT, E. KAISER, P. *An autofocus technique for imaging microscopy.* IEEE. 1992.

[17] GEUSEBROEK, Jan, CORNELISSEN, Frans, SMEULDERS, Arnold, GEERTS, Hugo;*ARobust autofocusing in microscopy;* Cytometry, Vol 39; 2000.

[18] HILSENTEIN, Volker; *ARobust autofocusing for automated microscopy imaging of flourecently labeled bacteria.*

[19] JONES, Douglas. *Midlevel Control of Stepping Motors.* The University of IOWA. [online] disponible en www.cs. uiowa.edu/~jones/step/midlevel.html.

[20] VALENTINE, Richard. *Motor control electronics handbook.* McGraw Hill. USA, 1998.

[21] L293D, datasheet. *Texas instruments*. Rev. Noviembre de 2006. [online], diponible en www.ti.com

[22] ALTAMAR, Hernando. *Análisis por variación del espesor de objetos de fase por interferometría shearing lateral en luz policromática*. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander. Escuela de física. 2004

[23] GÉLVEZ, Ángela. RODRIGUEZ, Julián. *Sistema de control visual para el posicionamiento de un equipo de adquisición de imágenes estelares*. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingenierías eléctrica, electrónica y telecomunicaciones. Febrero de 2006.

ANEXO A. OTROS ALGORITMOS DE MEDIDA DEL GRADO DE ENFOQUE

Además de los algoritmos expuestos en el cuerpo de éste documento, existen otros algoritmos propuestos en la literatura revisada sobre funciones de autoenfoque, los cuales se analizaron y probaron, pero que la calidad de sus resultados, ya sea en tiempo de cómputo o desempeño, no fueron considerados meritorios para un análisis más profundo y detallado. A continuación se expone la definición de tales algoritmos.

Contenido de la imagen con umbral (CIU).

Esta función suma los valores de los píxeles cuya intensidad se encuentra por encima de un umbral.

$$FM = \sum_{x=1}^{M}\sum_{y=1}^{N} I(x,y) \qquad I(x,y) > V \qquad \text{(A1)}$$

Conteo de píxeles con umbral (CPU)

Esta función cuenta los píxeles de la imagen que se encuentran por encima de un umbral [4]:

$$FM = \sum_{x=1}^{M}\sum_{y=1}^{N} s[I(x,y),V] \qquad s(x,V) = \begin{cases} 0, x \geq 0 \\ 1, x < 0 \end{cases} \qquad \text{(A2)}$$

Potencia de la imagen (PDI)

La suma de los valores al cuadrado de la intensidad de los píxeles [4]:

$$FM = \sum_{x=1}^{M}\sum_{y=1}^{N} I(x,y)^2 \qquad I(x,y) > V \qquad \text{(A3)}$$

Rango del histograma (RH)

Para el histograma h_k de la imagen *I(x,y)* se calcula [4]:

$$FM = \max\{k \mid h_k > 0\} - \min\{k \mid h_k > 0\} \qquad \text{(A5)}$$

Algoritmo F5 de Vollat. (F5V)

Una función basada en medidas de autocorrelación, definida como [4]:

$$FM = \sum_{x=1}^{M} \sum_{y=1}^{N} I(x, y) \cdot I(x+1, y) - MN \cdot \bar{I}^2 \qquad \text{(A6)}$$

Algoritmo BRENNER (BRE)

Calcula la diferencia entre la matriz I(x,y) con I(x,y) desplazada dos píxeles, y tiene en cuenta un umbral *V* para acumular la diferencia [4]:

$$\begin{aligned} FM &= \sum_{M} \sum_{N} \left| I(x, y+2) - I(x, y) \right|^2 \\ para, &\left| I(x, y+1) - I(x, y) \right| \geq V \end{aligned} \qquad \text{(A7)}$$

ANEXO B ASCOPE v1.0 GUÍA DEL USUARIO

AScope v1.0 es una herramienta de interfases gráficas que permiten al usuario configurar y programar un proceso de adquisición automática de imágenes. *AScope v1.0* fue diseñada para funcionar con el sistema de adquisición apropiado, el cual corresponde al desarrollado en el proyecto *Sistema De Adquisición Automática De Imágenes Para Microscopio Óptico*. *AScope v1.0* permite manejar de manera fácil y rápida dicho sistema de adquisición, permitiendo además la manipulación y almacenamiento de las imágenes adquiridas. El proceso de adquisición requiere del sistema completo, que incluye al Microscopio *Leite ORTHOLUX* con la cámara acoplada, la que a su vez va conectada al PC vía USB; la interfaz de comunicación PC-Motores que interconecta al puerto paralelo con los motores del sistema; y finalmente, el sistema mecánico con los motores que accionan el movimiento del microscopio.

REQUERIMIENTOS DE LA HERRAMIENTA

AScope v1.0 se desarrolló para funcionar con *l*a versión *7.0* o versiones posteriores del software bajo el cual fue elaborado, en plataforma de *Windows*® XP en adelante.

Sistema operativo	Windows® XP
Requerimientos de Software	Versión 7.0 del software de desarrollo.
Memoria disponible	256 MB
Requerimientos de hardware	Puerto paralelo Cámara USB

Tabla B 1. Requerimientos de la herramienta AScope

Instalación e inicialización.

La herramienta no requiere ninguna instalación especial. Solo se necesita copiar la carpeta de archivos y el archivo *AScope.m* dentro del directorio actual de trabajo. Para inicializar la herramienta, debe inicializarse primero el software bajo el cual fue desarrollada la herramienta, y luego se digita `AScope` en la ventana de comandos. La herramienta tarda unos segundos en mostrar la ventana inicial.

B.1 INICIAR ADQUISICIÓN.

Para iniciar una nueva adquisición, es necesario que el computador cuente con los periféricos apropiados (cámara Web con los controladores instalados y puerto paralelo) y el usuario debe asegurarse que la interfaz PC-Motores esté conectada apropiadamente. El usuario debe asegurarse además de la colocación de la muestra en el microscopio y las condiciones iniciales de éste (en cuanto a posición inicial e iluminación).

Una vez cumplidas las condiciones anteriores, el usuario puede proceder a iniciar una nueva adquisición. Para esto, debe digitar AScope en la ventana de comandos (ver sección anterior) y esperar a que se abra la ventana de la herramienta. Antes de que se abra la ventana correspondiente a *AScope v1.0,* se muestra una presentación que indica el estatus de la carga de la herramienta. Durante esta presentación el programa busca y configura al puerto paralelo y a la cámara USB del sistema de adquisición. La figura 1 muestra la ventana de la herramienta. Inicialemte, el usuario puede interactuar con las opciones de menú *Archivo,* como son iniciar un nuevo proceso de adquisición, cargar una configuración de adquisición o cargar imágenes previamente adquiridas para su observación.

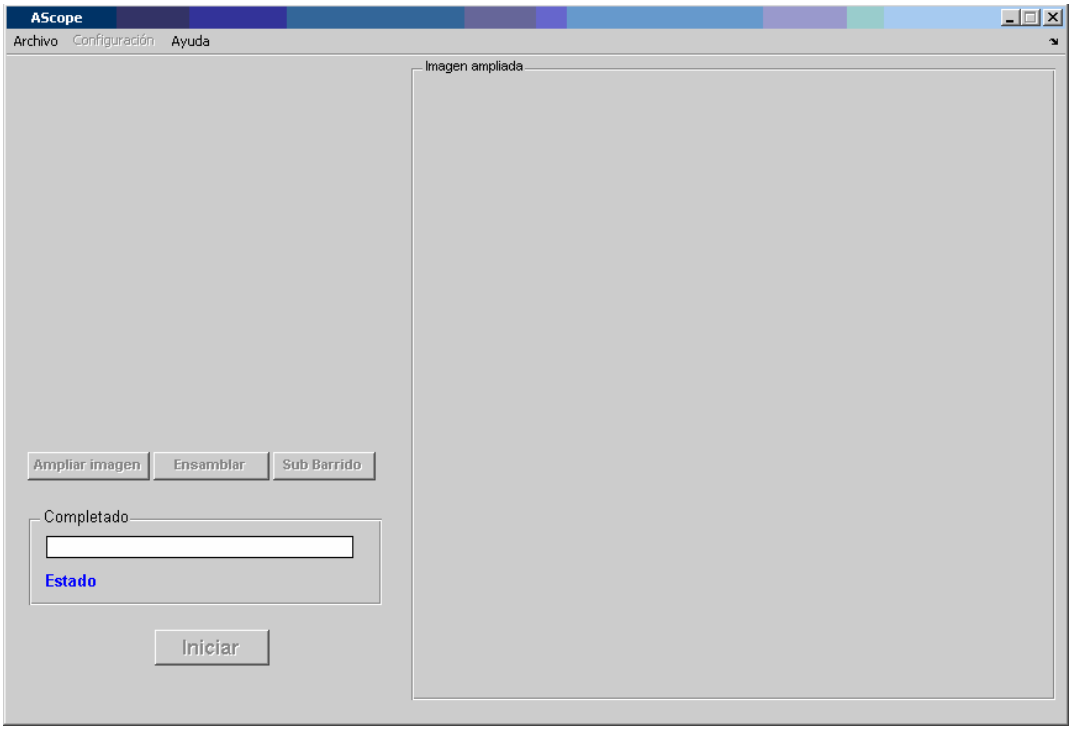


Figura B 1. Ventana de *AScope v1.0*

Nueva configuración

La herramienta lleva a cabo los procesos de adquisición según ciertos parámetros que define el usuario, tales como el aumento (lente en el objetivo del microscopio que se va a utilizar), la calidad del enfoque, el área de barrido (Área sobre la cual se va a llevar a cabo el proceso de adquisición) y el Patrón de barrido (que indica la manera en que el sistema hará el barrido sobre el área de adquisición).

Una nueva adquisición puede llevarse a cabo configurando, desde el principio, sus parámetros (aumento, calidad del enfoque, el área de barrido, etc), o cargando una configuración previamente guardada.

Para iniciar una nueva adquisición configurando todos sus parámetros, el usuario debe seleccionar el menú *Archivo>>Nueva adquisición>>Nueva configuración* (ver figura 2).

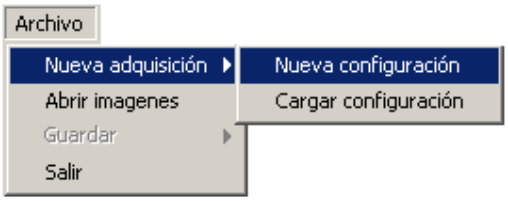


Figura B 2. Para iniciar una nueva adquisición configurando sus parámetros, el usuario debe seleccionar *Archivo>> Nueva adquisición>> Nueva configuración.*

Una vez seleccionada *Nueva Configuración* el usuario debe configurar los parámetros de la adquisición (ver Configuración de nueva adquisición).

Cargar configuración

Cuando el usuario realiza con frecuencia procesos de adquisición con los mismos parámetros de aumento, área de barrido, calidad de barrido, etc, resulta bastante útil guardar dicha configuración (ver guardar configuración) para ser cargada posteriormente (y así evitar la repetición del mismo proceso de configuración).

Para cargar una configuración previamente guardada, el usuario debe seleccionar el menú *Archivo>>Nueva adquisición>>Cargar Configuración*. El usuario debe asegurarse que los parámetros de aumento, calidad de enfoque, área de barrido, etc., se ajustan a sus necesidades actuales. Cuando el usuario selecciona esta opción, en la ventana de comandos aparece información en pantalla sobre la configuración que seleccione el usuario.

Una vez seleccionada la configuración a cargar, el usuario puede iniciar inmediatamente el proceso de adquisición.

Abrir imágenes adquiridas

Le permite al usuario abrir un conjunto de imágenes previamente adquiridas y guardadas en un archivo (ver guardar imágenes), para visualizarlas o ensamblarlas. Las imágenes guardadas deben ser producto de un proceso de adquisición llevado a cabo en alguna sección anterior. Para abrir imágenes previamente adquiridas, el usuario debe seleccionar *Archivo>>Abrir Imágenes.*

Al abrir una configuración o un conjunto de imágenes, si el archivo seleccionado no es válido, se produce un error y se interrumpe el programa.

B.2 CONFIGURACIÓN DE NUEVA ADQUISICIÓN

En esta sección se describe cómo configurar los parámetros para iniciar un nuevo proceso de adquisición.

Una vez seleccionada la opción *Nueva adquisición>>Nueva configuración* en la ventana de inicio de la herramienta, se abre la ventana *Configuración General* que permite definir algunos parámetros. La figura 2 muestra la ventana de configuración general. En esta ventana el usuario puede definir opciones como el modo de adquisición, Aumento del microscopio y calidad del enfoque.

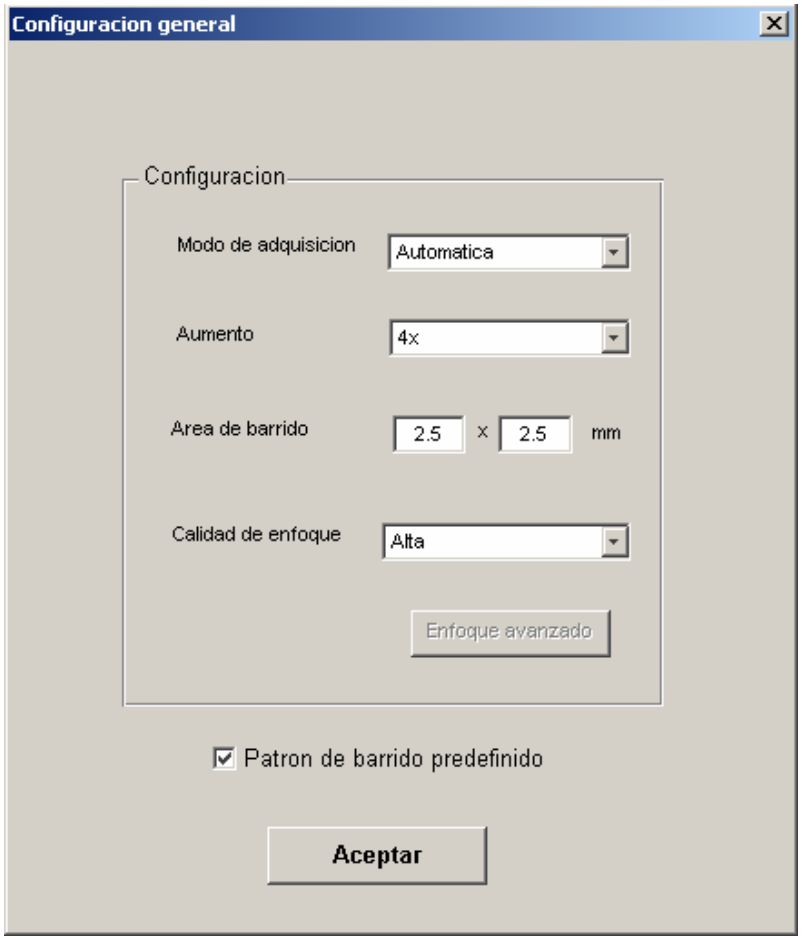


Figura B 3. Ventana de Configuración general

Modo de adquisición

Le permite al usuario seleccionar entre tres opciones: Automático, semiautomático o manual.

- *Automático* configura al sistema para que, una vez definida el área de barrido, éste realice una adquisición de imágenes en la totalidad de ésta, sin intervención ni monitoreo del usuario. Este es el modo de adquisición para el cual se diseñó el sistema originalmente. En este modo, una vez se inicia el proceso de adquisición, éste no se detiene sino hasta llegar a su término.
- *Semiautomático.* Este modo de adquisición no se ha desarrollado aún para la herramienta pero está abierto para posteriores mejoras de la misma.
- *Manual* permite al usuario manejar los movimientos del microscopio a través de los controles electrónicos que se incluyen en el *sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico*. En este modo de adquisición, el PC sirve solo para visualizar cómodamente las imágenes captadas por el microscopio, permitiendo además el almacenamiento de las mismas.

Aumento.

En este campo el usuario define el aumento del microcopio para el cual se quiere configurar la adquisición. Este parámetro es necesario para que el sistema pueda determinar la amplitud de los movimientos y el tamaño (en mm) de las imágenes a captar a través de la cámara.

Area de barrido

En este campo el usuario digita el área de barrido, en milímetros, sobre la cual se hará el proceso de adquisición automática.

Calidad de enfoque.

En este campo el usuario define la calidad del enfoque a utilizar, teniendo en cuenta que una mayor calidad de enfoque demanda mayor tiempo de cómputo y hace al proceso de adquisición más lento. El usuario puede seleccionar una calidad de enfoque avanzada para definir explícitamente la(s) función(es) de enfoque a utilizar así como también los parámetros de medición del enfoque.

Para mayor comprensión de las funciones de enfoque y los parámetros de medición ver el informe del proyecto *sistema de adquisición automática de imágenes para microscopio óptico*. Enfoque avanzado Cuando el usuario selecciona calidad de enfoque avanzada se habilita el botón que abre la ventana de *enfoque avanzado* (ver adelante).

Enfoque avanzado.

La ventana de enfoque avanzado (ver figura 4) permite al usuario especificar el tipo y el área de medida de la función de foco. En *tipo de medida* el usuario puede seleccionar entre 'Multiple' o 'Central', y especificar así si la función de foco realiza un muestreo distribuido o centrado en la imagen original

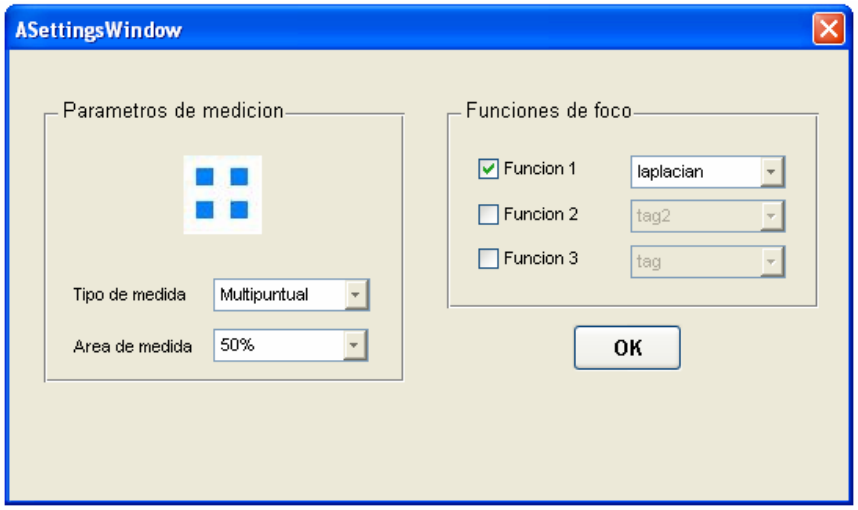


Figura B 4 Ventana de opciones de enfoque avanzado.

ENFOQUE AVANZADO	
MODO DE MEDICIÓN	**DESCRIPCIÓN**
Central	**La función de medida de foco se aplica solo en una región en el centro de la imagen original**

Multi	**La función de medida de foco se aplica en cuatro regiones distribuidas en la imagen original.**

Tabla B 2. Modos de selección para el área de medición

En área de medida el usuario especifica qué porcentaje en área de la imagen original será analizada. Esto influye en el tamaño de las regiones especificadas en *modo de medición*

En *funciones de foco*, el usuario puede seleccionar hasta tres, para hacer un cálculo redundante del foco de la imagen. El algoritmo de enfoque utiliza principalmente la primera función de foco y hace uso de la segunda y tercera función de enfoque para verificar los resultados. Esto, obviamente afectará el tiempo del enfoque.

Patrón de barrido predefinido

Si el usuario habilita esta opción, sobre el área de adquisición, el sistema llevará a cabo un patrón de barrido que inicia en la esquina superior izquierda y avanza con movimientos en la dirección del eje X. Si el usuario deselecciona esta opción, una vez definidos los demás parámetros de la configuración, deberá definir el patrón de barrido (ver definición del patrón de barrido)

DEFINICIÓN DEL PATRÓN DE BARRIDO

El patrón de barrido corresponde a los movimientos que va a realizar el microscopio para hacer el barrido de la muestra. Deshabilitando la opción *Patrón de barrido predefinido* de la ventana de configuración general, se abre el cuadro de diálogo *Definir patrón de barrido* (ver figura 5). En *Patrones* el usuario puede seleccionar entre establecer un patrón predefinido o, si lo

prefiere, crear paso a paso su propio patrón manual. También puede especificar el área de barrido.

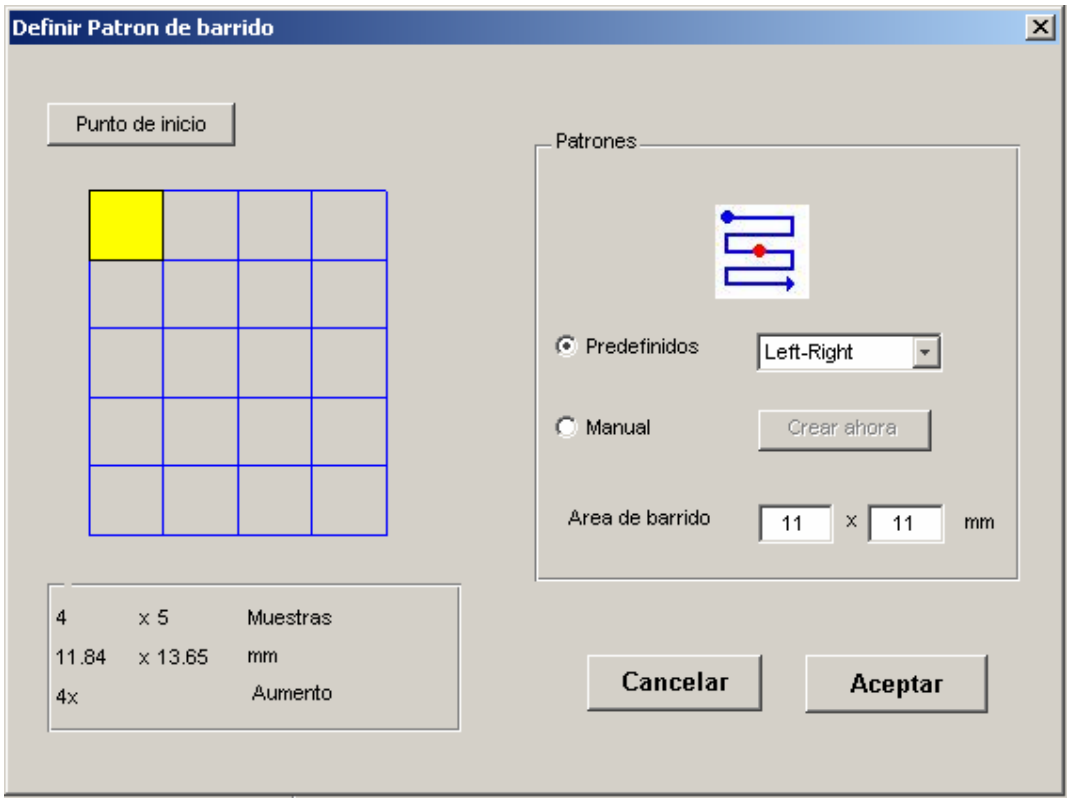


Figura B 5 Ventana para definir el patrón de barrido.

Dado que en el ocular del microscopio no se puede observar la totalidad del área de adquisición (sino una porción de ésta), el sistema la divide tantas *Muestras* como sea necesario para abarcar toda el área de barrido. Durante el proceso, el sistema irá posicionando el ocular del microscopio en cada una de estas muestras hasta completar toda el área de adquisición. En la parte izquierda de la ventana *Definir patrón de barrido* aparece una vista preliminar de la forma en que el sistema dividirá el área de barrido. La vista preliminar muestra ventanas proporcionales a las ventanas de adquisición real y, en la parte inferior, aparece alguna información sobre el área de barrido (ver figura 6).

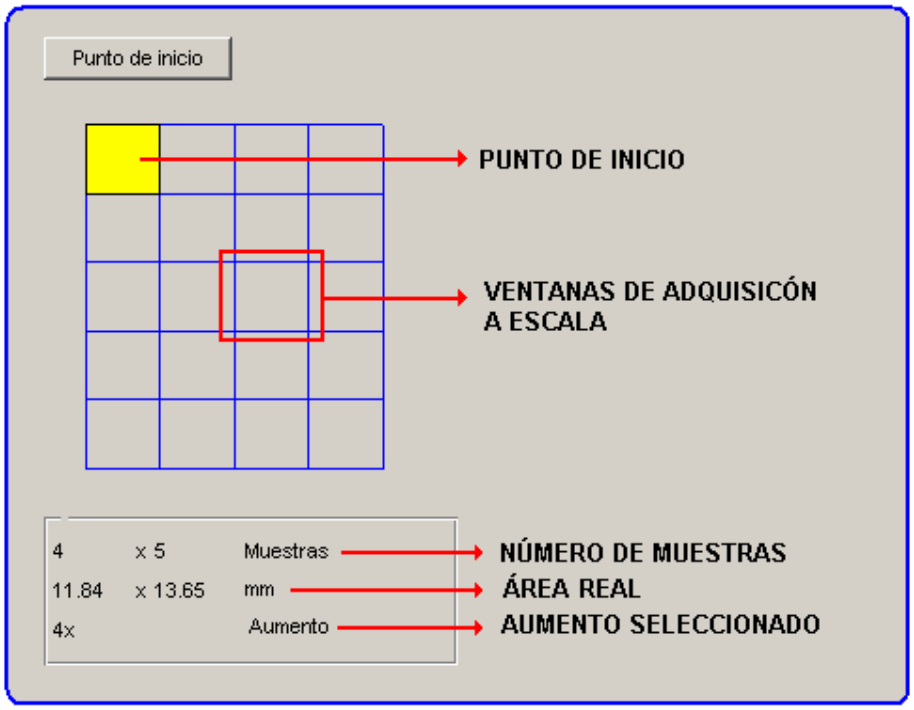


Figura B 6. Vista preliminar del área de barrido. En amarillo aparece el punto de inicio del barrido.

El área indicada en la información de la vista preliminar es el área de barrido real de adquisición. Ésta puede ser ligeramente mayor al área especificada por el usuario dado que, por limitaciones en la resolución del sistema mecánico, las ventanas de adquisición solo pueden tener tamaños discretos (ver área de barrido)

Patrones Predefinidos

La herramienta cuenta con cuatro patrones predefinidos entre los cuales el usuario puede seleccionar el de preferencia.

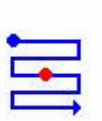
PATRONES PREDEFINIDOS	
TIPO DE BARRIDO	**DESCRIPCIÓN**
 ***Left-Right***	**Barrido con movimientos laterales. Por defecto, el sistema asume que la posición de inicio corresponde a la esquina superior izquierda de la muestra.**
Up-Down	**Define un barrido con movimientos hacia arriba y hacia abajo. Punto de inicio por defecto en esquina superior izquierda**
Circle-In	**Define un barrido en espiral hacia adentro. El punto de inicio por defecto es la esquina superior izquierda y NO puede ser modificado por el usuario**.
Circle-Out	**Barrido en espiral hacia fuera. Al seleccionar este patrón el usuario debe asegurarse de que la posición inicial del objetivo del microscopio se encuentra mas o menos en el centro de la muestra**

Tabla B 3. Patrones de barrido predefinidos

Para los patrones *Left-Right* y *Up-Down* el usuario puede modificar el punto de inicio pulsando el botón

y señalando en la vista preliminar, con un clic del Mouse, el nuevo punto de inicio.

Patrón de barrido manual

Esta opción de patrón de barrido le permite al usuario definir paso a paso el patrón o recorrido que realizará el sistema en el proceso de adquisición. Al activar la casilla correspondiente, el usuario puede iniciar la definición del patrón de barrido manual pulsando el botón

Luego, la herramienta pide al usuario indicar el número total de muestras que desea tomar (que corresponde al número de ventanas de adquisición), y el usuario puede proceder a señalar con el Mouse, una a una, las muestras que desea adquirir. El proceso de barrido se hará en el mismo orden en que el usuario señaló durante la definición del patrón manual.

ÁREA DE BARRIDO

Para definir el área de barrido el usuario digita el área de adquisición en las casillas correspondientes. Dado que el sistema mecánico solo permite desplazamientos horizontales con una resolución limitada (pasos de 148um en X y de 304um en Y), el sistema ajusta automáticamente el área de barrido al mayor valor posible mas cercano al seleccionado por el usuario.

B.3 ADQUISICIÓN AUTOMÁTICA

Una vez el usuario configura una nueva adquisición o carga una configuración de adquisición guardada (ver cargar configuración), se abre la ventana correspondiente a *adquisición automática*. Inicialmente, la ventana se muestra como se observa en la figura 7. La ventana inicial muestra una vista preliminar del área de adquisición (la misma que se puede observar al definir patrón de barrido). También se puede observar una barra que indica el progreso del proceso y un texto *Status* que indica la acción actual que está realizando el sistema (que puede ser Moviendo platina, enfocando o guardando imagen).

Para iniciar la adquisición automática, el usuario solo debe pulsar

el botón y permitir que el sistema realice la adquisición, la cual una vez iniciada, no se puede interrumpir antes de haberse terminado.

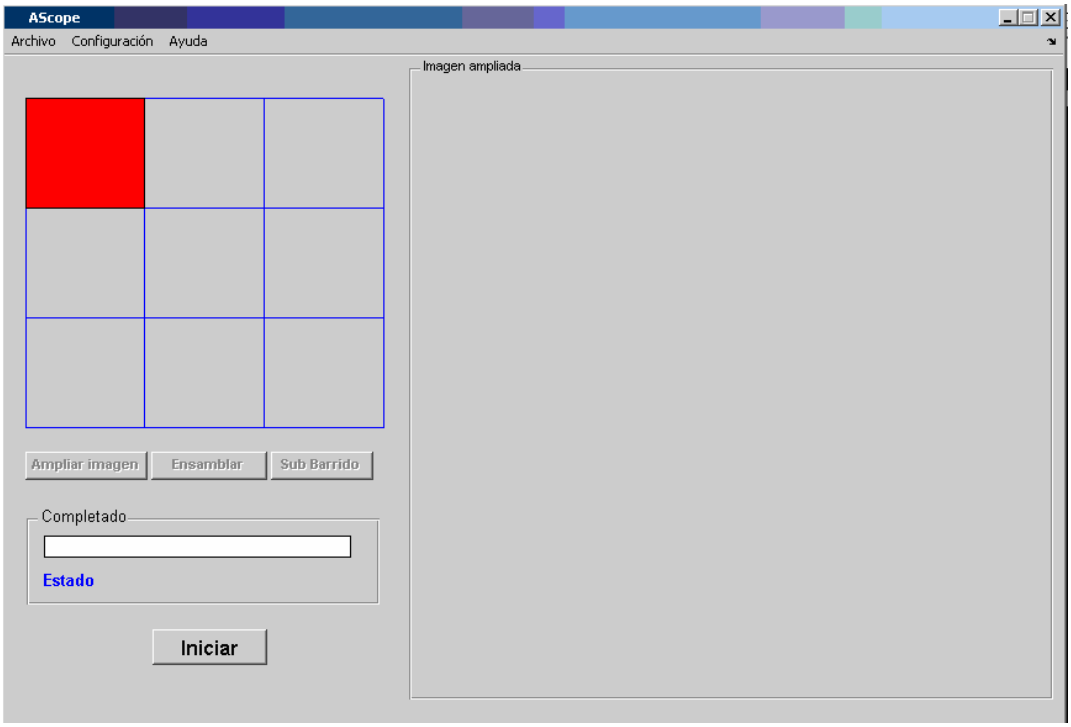


Figura B 7. Ventana para realizar el proceso de adquisición.

A medida que el sistema va recorriendo la muestra, en la vista preliminar se va mostrando una impresión a escala de las imágenes adquiridas. Al mismo tiempo, la barra de progreso va avanzando y el texto de *Status* indica la acción actual que está realizando el sistema.

Una vez culminado el barrido, se activarán los botones de ampliar imagen, ensamblar y sub-barrido.

Figura B 8. Visualización de la adquisición

Ampliar Imagen

Una vez se ha terminado el barrido y se activa el

botón el usuario puede ampliar cualquiera de las imágenes en las que se subdivide la vista preliminar. Para esto, el

usuario pulsa el botón y luego señala con un clic del Mouse la imagen que desea ampliar. Ésta aparece ampliada en la parte derecha de la ventana de adquisición. Ahora si el usuario desea ver la imagen seleccionada en tamaño real (con la

resolución en píxeles que fue tomada), puede pulsar el botón y la imagen se abrirá en una ventana independiente que le permitirá al usuario guardarla si lo desea.

Ensamblar imagen

La función de este botón no se ha desarrollado aún pero está abierto a mejoras futuras en la herramienta.

Sub Barrido

Una herramienta muy práctica y de bastante utilidad durante la revisión de una muestra es el *Sub barrido*. Una vez terminada una adquisición en un aumento inferior a 40x, el usuario puede definir de manera muy sencilla un segundo proceso de adquisición sobre una región de la muestra ya adquirida.

Para realizar un sub barrido, el usuario pulsa el

botón y luego selecciona, sobre la vista preliminar, un recuadro con el Mouse para definir la región donde desea efectuar el sub barrido (ver figura 8)

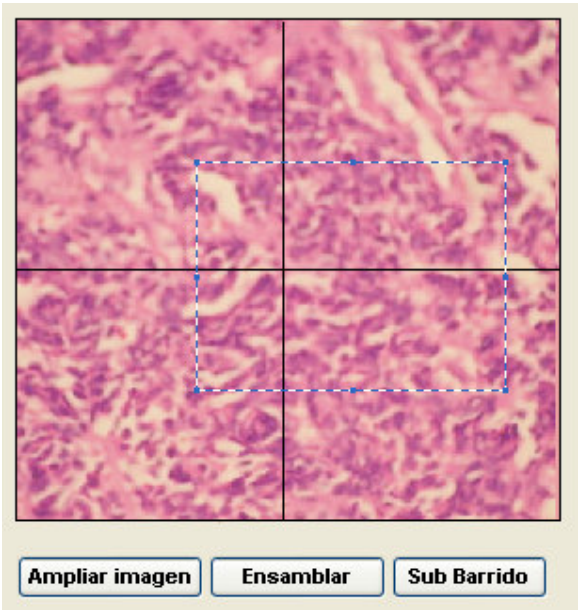


Figura B 9. Adquisición finalizada

Para definir seleccionar área de sub-barrido se hace clic con el Mouse y se arrastra el puntero hasta encerrar el área deseada.

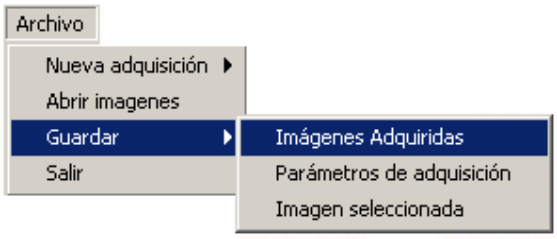
A continuación la herramienta pregunta con qué aumento se va a realizar el barrido y si se desea un patrón de barrido automático o si el usuario prefiere definir el patrón en la ventana de *Definir patrón de barrido*.

Al efectuar un sub barrido el usuario debe cambiar, manualmente, al aumento del microscopio al valor deseado. Sin embargo, no debe modificar la posición de la platina pues esta se reubicará automáticamente.

B.4. GUARDAR Y CARGAR UNA CONFIGURACIÓN

Con la herramienta *AScope* el usuario puede definir una configuración de adquisición y guardarla para realizar la adquisición mas tarde o para adquirir nuevas muestras con la misma configuración.

Para guardar una configuración, una vez en la *ventana de adquisición*, el usuario selecciona el menú: *Archivo>>Guardar>>Parámetros de adquisición.*



Para cargar una configuración guardada, el usuario debe seleccionar la opción Cargar Adquisición en la ventana de inicio de *AScope*.

B.5. GUARDAR Y CARGAR IMÁGENES ADQUIRIDAS

La herramienta *AScope* permite también guardar y cargar imágenes adquiridas. Para guardar, después de terminar un barrido en la ventana de *Adquisición Automática*, se selecciona *Archivo>>Guardar>>Imágenes adquiridas.* Es posible cargar imágenes desde la ventana de inicio de *AScope*.

Una vez en la ventana de *adquisición automática* es posible abrir imágenes guardadas previamente seleccionando *Archivo>>Abrir imágenes*

B.6 INFORMACIÓN EN PANTALLA

Una vez se inicia la herramienta *AScope*, en la pantalla de comandos comienza a aparecer información sobre las acciones llevadas a cabo por el usuario y las respuestas de la herramienta a dichas instrucciones. La información en pantalla resulta particularmente útil al describir los siguientes eventos:

- ✓ Informar sobre detección de Hardware (cámara y puerto paralelo)
- ✓ Informar sobre configuración de Hardware
- ✓ Informar sobre errores en la detección y configuración del hardware.
- ✓ Describir una configuración de adquisición al seleccionar *Cargar Adquisición*
- ✓ Dar información sobre los parámetros de barrido al seleccionar sub barrido.
- ✓ Informar sobre procesos de guardar configuraciones o imágenes

Al final de una sesión de trabajo, el usuario puede revisar la ventana de comandos y verificar las diferentes acciones llevadas a cabo durante la sesión.

ANEXO C. PLANOS Y FOTOGRAFIAS ILUSTRATIVAS

El soporte mecánico para los motores X-Y comprende un conjunto de cinco piezas, que ensambladas tienen el aspecto que se muestra en la figura C1. Las figuras C2 a C6 detallan cada una de estas piezas. Posteriormente se muestran fotografías del microscopio

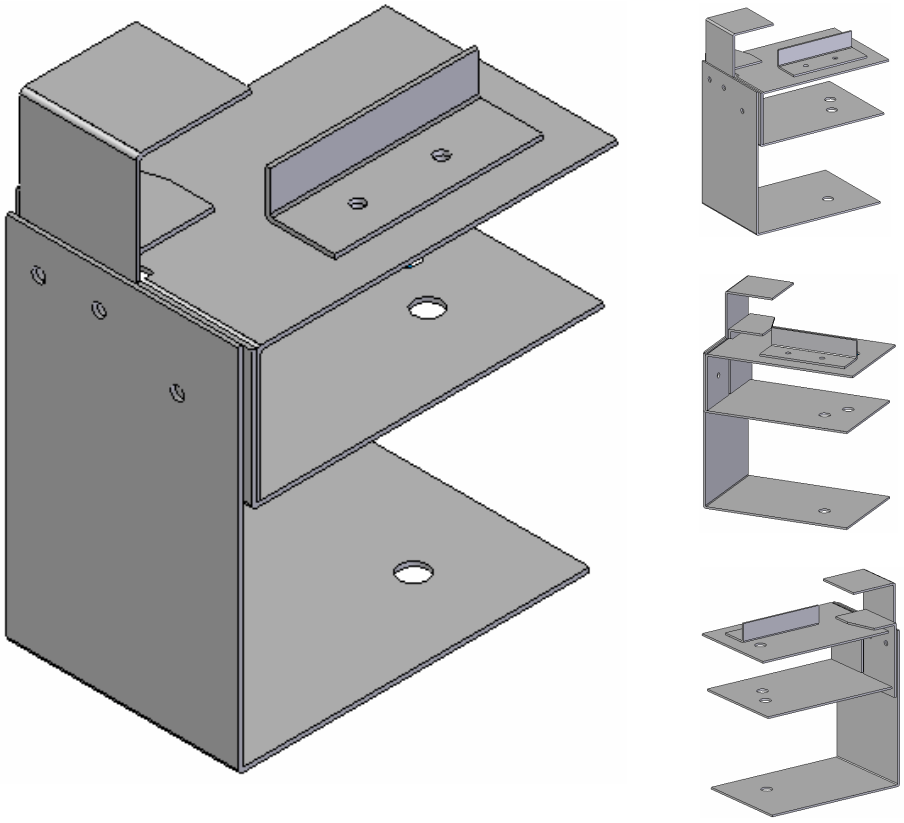


Figura C 1. Soporte mecánico de los motores.

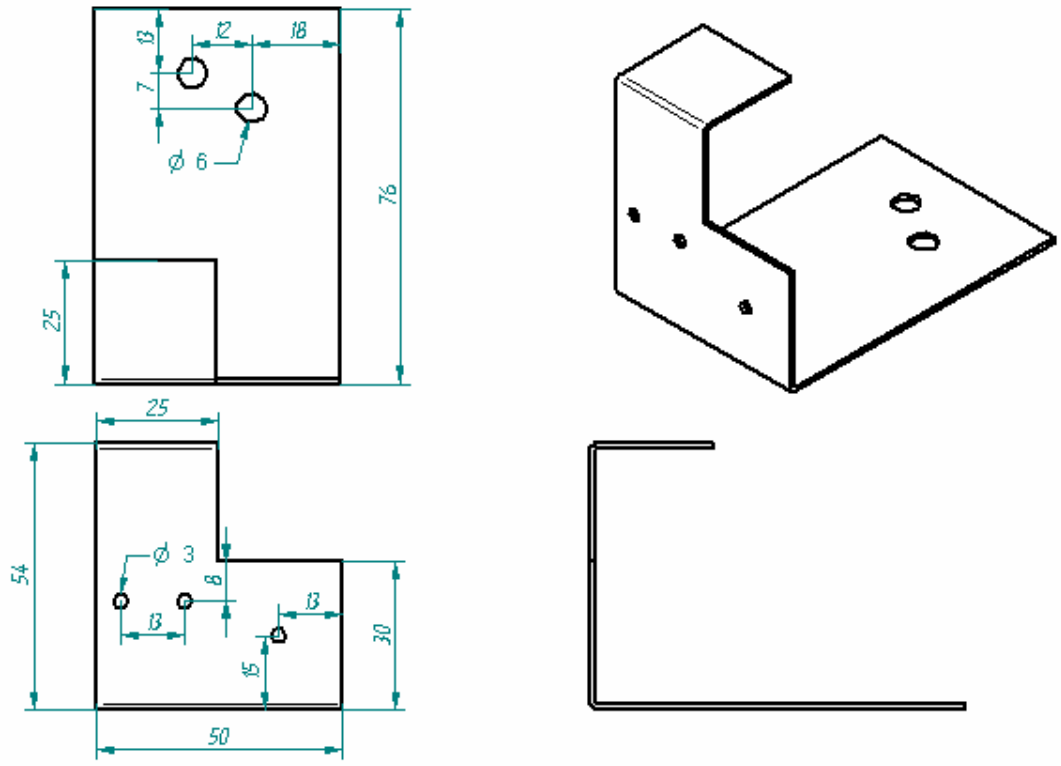


Figura C 2. Pieza número uno.

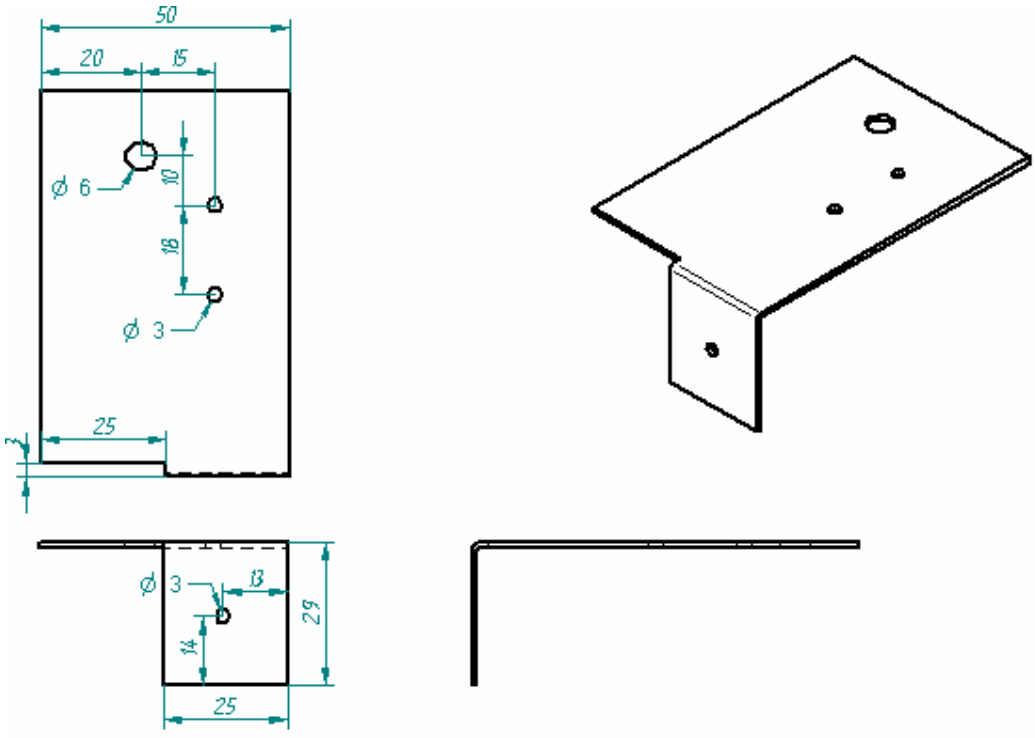


Figura C 3. Pieza número dos

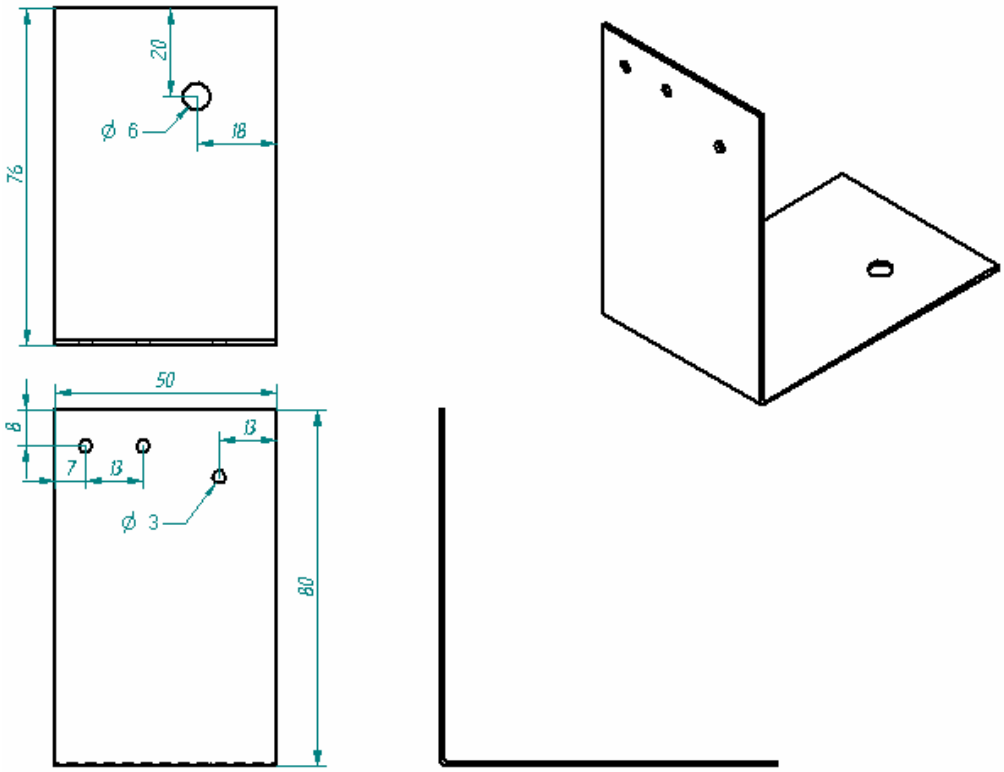


Figura C 4. Pieza número tres

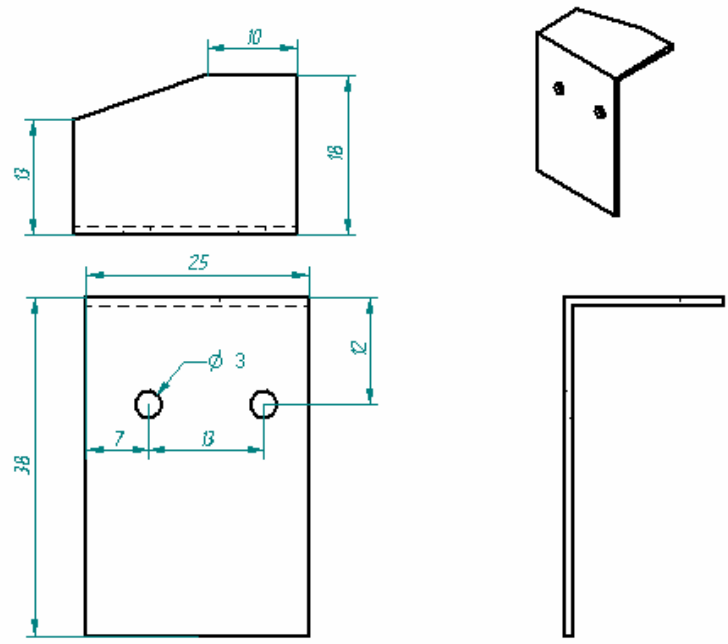


Figura C 5. Pieza número cuatro.

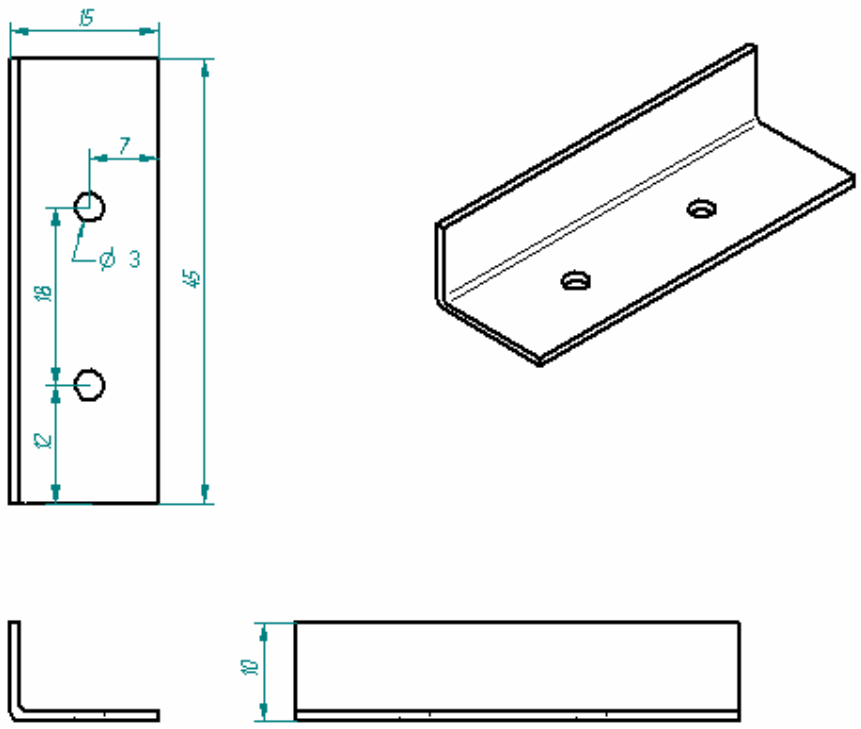


Figura C 6. Pieza número cinco.

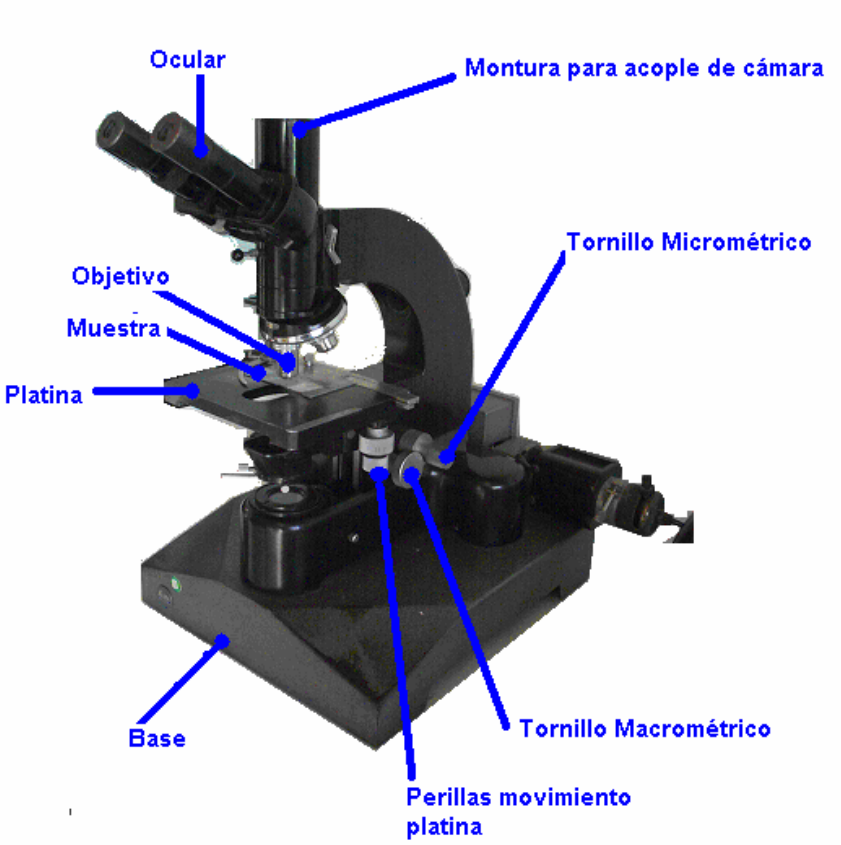


Figura C7. Principales partes del microscopio a automatizar

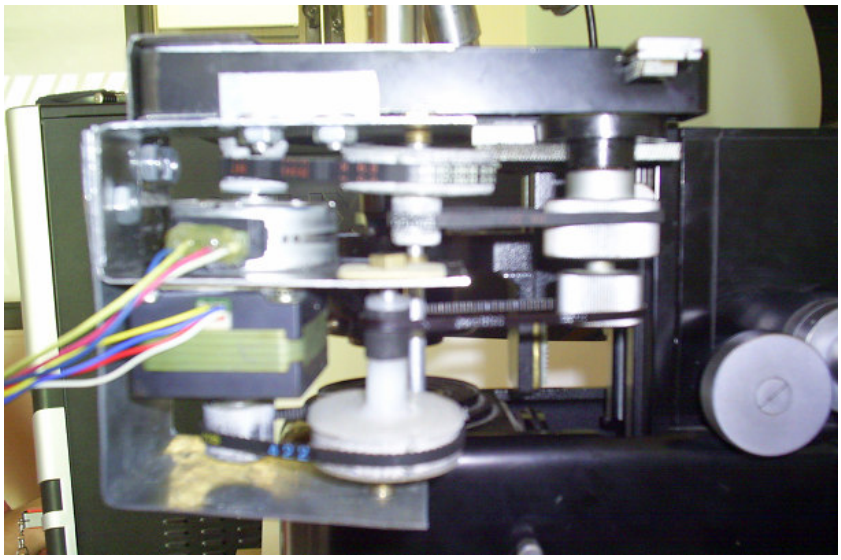


Figura C8. Disposición del sistema mecánico para controlar las perillas de los movimientos X-Y de la platina del microscopio

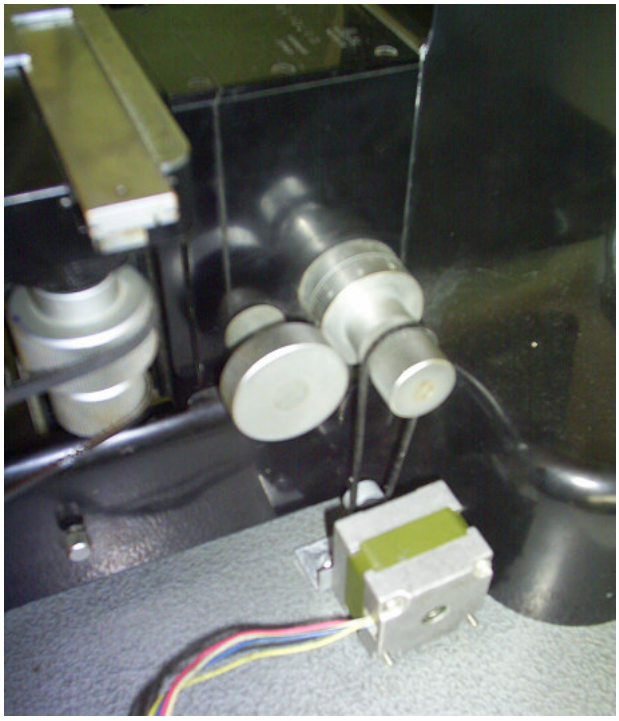


Figura C9. Disposición del sistema mecánico para controlar el tornillo micrométrico

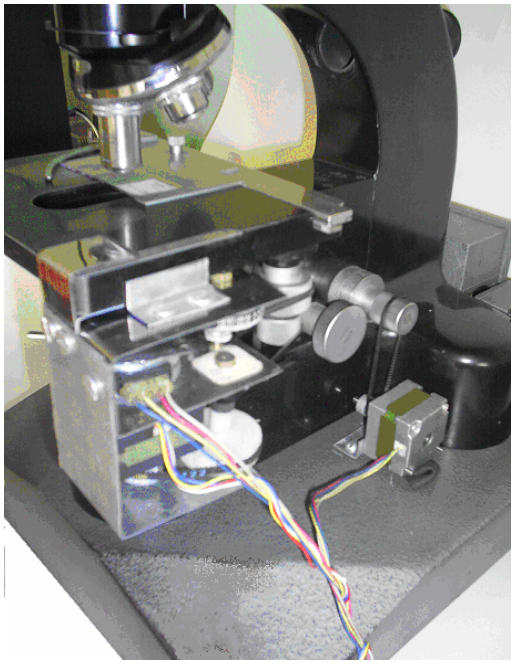


Figura C10. Vista general del control de movimiento de la platina

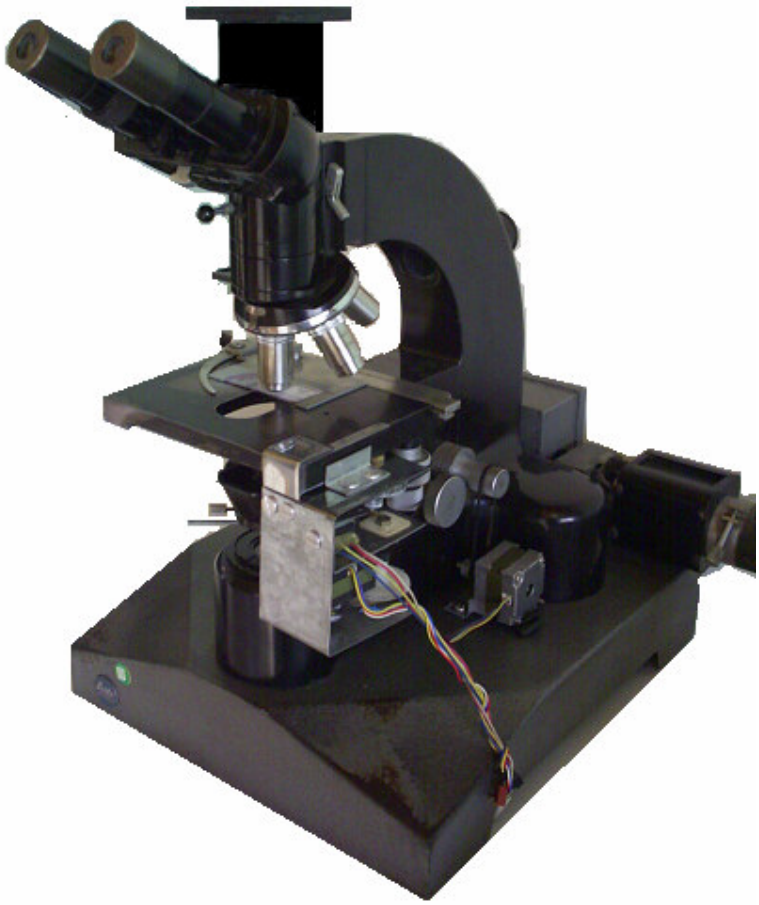


Figura C11. Microscopio con las partes mecánicas adicionadas para su automatización.