

Trabajo Fin de Grado

Estudio de la Concentración de Oxígeno en Células y
Tejidos mediante Técnicas de Fluorescencia, Adquisición
y Procesado de Imágenes

Autor

Darío Martín Buil

Director

Félix Antonio Sotelo Hermida

Ponente

Juan Ignacio Garcés Gregorio

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Año 2014

memoriae duplex virtus

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecerle a Nacho por haberme animado con el proyecto, y ayudarme con la revisión de la memoria.

Me gustaría nombrar también a los chicos del laboratorio, José Ramón, Isabel, Carlos, José Antonio y Miguel, por la cálida acogida y consejos durante todo este tiempo. También quisiera darle las gracias a David, por su ayuda con los grandes detalles del proyecto y sobretodo a mi director, Félix, por su apoyo desde el primer día.

Por último, quiero darle las gracias de corazón a mis padres, por todos los esfuerzos y sacrificios que han hecho para que pudiera llegar hasta aquí; que este proyecto, en cierta manera, también lleva un pedazo suyo.

Resumen

En este proyecto se afronta el estudio de la concentración de oxígeno en células y tejidos mediante el diseño de un sistema de medición basado en microscopía de fluorescencia. Partiendo de otros montajes similares, se tratan tanto la parte física como la captación de imagen mediante una cámara digital, y el software necesario para aplicar técnicas de filtrado y procesamiento de imagen necesarias para extraer los datos que lo relacionen con su concentración de oxígeno de forma automática.

Para tal fin se ha diseñado un montaje compuesto por la microscopía, la platina móvil donde se colocan el sensor con las muestras a medir y la iluminación con su electrónica de control. Todo ello controlado a través de una interfaz gráfica, como es una aplicación de escritorio para ordenador.

Esta aplicación permite la visualización de los datos tomados en tiempo real, así como su almacenamiento y exportación a formatos de uso común para un análisis y estudio posteriores.

Palabras Clave: Fluorescencia, Oxígeno, Porfirina, Filtrado, Imagen, Cámara.

Tabla de contenidos

| | |
|--|-----|
| Agradecimientos..... | i |
| Resumen | iii |
| Tabla de contenidos..... | v |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Antecedentes..... | 2 |
| 3. Materiales y Métodos | 3 |
| 3.1. Placa del Sensor | 3 |
| 3.2. Análisis Espectral de la Fuente y Sensor de la Cámara | 6 |
| 3.2.1. Espectro de los LED y la fuente..... | 6 |
| 3.2.2. Análisis del mosaico de imagen | 7 |
| 3.3. Microscopía | 8 |
| 3.4. Cámara..... | 9 |
| 3.5. Control de Iluminación..... | 11 |
| 4. Descripción del Software..... | 13 |
| 4.1. Captación, Procesado y Filtrado de Imagen | 14 |
| 4.1.1. Captación y almacenamiento en el buffer..... | 14 |
| 4.1.2. Lectura y filtrado de datos de imagen | 15 |
| 4.1.3. Procesado y extracción de parámetros de oxígeno | 16 |
| 4.2. Interfaz Gráfica de Usuario (GUI) | 19 |
| 4.2.1. Ventana Principal..... | 19 |
| 4.2.2. Ventana de Canales RGB..... | 22 |
| 4.2.3. Ventana de Frame | 22 |
| 4.2.4. Ventana de Gráficas de Datos..... | 22 |
| 4.2.5. Ventana de Histogramas | 22 |
| 5. Medidas Experimentales..... | 23 |
| 5.1. Calibración de la Cámara | 23 |
| 5.2. Cultivo de células..... | 27 |
| 6. Conclusiones | 28 |
| 7. Líneas de investigación futuras | 29 |
| 8. Bibliografía | 30 |
| 9. Planificación | 31 |

| | |
|---|-------------------|
| Anexo A. Representación de Color. Filtro de Bayer. | I |
| Representación de Color..... | I |
| Filtro de Bayer..... | II |
| Anexo B. Formatos de imagen. Algoritmo de <i>Demosaico</i> y | |
| Conversión..... | V |
| Formatos de Imagen..... | V |
| <i>Demosaico</i> y Conversión..... | VII |
| Anexo C. Hojas de Especificaciones..... | IX |
| Principales características de la cámara | IX |
| Especificaciones del Sensor CCD ICX2005AK..... | XIII |
| LED Azul en 405nm, 405-02V | XXII |
| Filtro Óptico 475nm, 25mm..... | XXIV |
| Transistor de propósito general, BC107 | XXV |
| Anexo D. Software. Librerías | XXVII |
| AForge.NET | XXVII |
| <i>Imagen. Métodos originales utilizados</i> | <i>XXVII</i> |
| <i>Imagen. Metodos diseñados para la aplicación.....</i> | <i>XXVIII</i> |
| FFmpeg..... | XXIX |
| Anexo E. Instalación de la Aplicación. | XXXI |
| Índice de Figuras..... | XXXIII |
| Acrónimos | XXXV |

1. Introducción

El oxígeno es uno de los elementos más importantes presente en multitud de procesos bioquímicos, no sólo en cuanto a procesos biológicos, sino también en una amplia diversidad de campos en los que el pronosticar con exactitud su comportamiento es de gran relevancia.

El uso de nuevos métodos de medición basados en colorimetría y fluorescencia se distinguen por ser menos invasivos además de abrir la puerta a procedimientos más específicos que no podían llevarse a cabo hasta la fecha debido a la sensibilidad de los cultivos o a la dificultad de la toma de mediciones.

Hasta ahora la mayoría de sensores de oxígeno realizaban las mediciones de forma global, únicamente indicando una concentración media sin especificar su distribución sobre las zonas de estudio. El objetivo de este proyecto es proporcionar una nueva herramienta de medición de oxígeno que permita obtener no sólo la concentración en media, sino también la visualización en dos dimensiones de la distribución real del oxígeno en el cultivo.

En este proyecto se aborda el diseño de un sistema de medición de concentración de oxígeno en cultivos celulares y tejidos basado en técnicas de fluorescencia microscópica, tanto la parte física del montaje como su captación de imagen mediante una cámara digital, y el software necesario para aplicar técnicas de filtrado y procesado de imagen necesarias para extraer los parámetros de oxígeno.

Con ese fin se diseñó un montaje compuesto por un sensor CCD y un sistema de microscopía, la platina móvil donde se colocan el sensor con las muestras a medir y la iluminación con la electrónica de control, todo ello conectado a través de una aplicación de escritorio para ordenador. Esta aplicación dispone de una interfaz de usuario que posibilita la visualización de los datos tomados en tiempo real, así como su guardado y exportación a formatos de uso común para un análisis y estudio posteriores.

Este proyecto es la fase preliminar a experimentos de mayor envergadura en cuanto a lo que estudios concentraciones de oxígeno se refiere; la posibilidad de embeber este sistema, de relativamente pequeño tamaño, permite su utilización dentro de cámaras de cultivo en condiciones de laboratorio controladas.

2. Antecedentes

Este proyecto parte de algunos conceptos y métodos de estudios anteriores relacionados con técnicas de fluoroscopia para concentraciones de O_2 .

Las técnicas recogidas en [1] tales como el uso de electrodos Clarke se caracterizan por dar una medida general de la concentración. La gran diferencia de tamaño entre la sonda Clarke comparada con un macrófago común hace que sea casi imposible la detección del ratio de consumo de oxígeno de un área pequeña.

Por otro lado, el uso de otras técnicas como los sistemas de escáner por electroquímica microscópica suponen una contaminación de las muestras al inicio debido a la emisión de peróxidos y OH^- que puede desencadenar un incremento de las tasas de muerte celular o el aumento del pH, respectivamente.

El uso de técnicas ópticas basadas en fluorescencias muestra unos buenos resultados tanto en cuanto a la no contaminación de los cultivos se refiere, sobretodo con el incremento de la popularidad en el uso de compuestos de porfirinas sensibles al oxígeno al ser excitadas bajo luz azul como método de monitorización de oxígeno en fluidos [2], principalmente dada su compatibilidad en experimentos con bacterias y células eucariotas [1].

En [3] se hace de la emisión en la zona roja del espectro de estos compuestos de porfirinas en conjunto con fluoróforos de naftalimida tomados como referencia en verde, en un sistema muy similar al abordado en este proyecto. La medición de ratios en lugar de la mera intensidad de emisión conlleva una mayor robustez y fiabilidad del sistema; tanto es así que ya hay reactivos comerciales basados en esta idea. Sin embargo, el sistema se ve limitado debido a la obligación de realizar extracción de resultados una a una, debiendo tomar las imágenes postprocesarlas de forma manual.

3. Materiales y Métodos

En este apartado se abordan los fundamentos clave en los que se basa el sistema de detección de oxígeno, desde el sensor de microfluídica y el encapsulado y sus principios químicos, pasando por el análisis del sensor CCD hasta la parte de microscopía.

3.1. Placa del Sensor

El sensor está compuesto por un chip de microfluídica sobre el que se sitúa una lámina que reacciona con la muestra en presencia de oxígeno, como se ve en la fig.3.1.

El chip sensor está protegido por una carcasa micromecanizada de metacrilato, que sirve tanto de soporte para sujetarlo al montaje como de protección a la hora de manipularlo. La carcasa dispone de diversas entradas y salidas por las que se inyectan las diferentes soluciones, se alimenta a las células o se recogen los deshechos. Tanto el chip como el encapsulado fueron diseñados por el GEMM (*Group of Structural Mechanics and Material Modelling*) de la Universidad de Zaragoza.

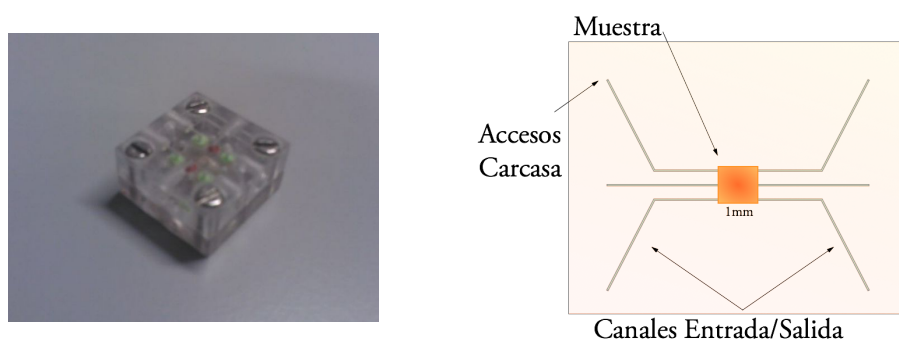


Figura 3.1. Fotografía del sensor con la carcasa de metacrilato (a). Diagrama del chip (b).

El chip de microfluídica está compuesto por un polímero fotoresistivo negativo de base de epoxy, SU-8. Sobre él se sitúa una lámina que es la que reacciona con el oxígeno causando la fluorescencia; en las pruebas se utilizó una lámina de 1mm² del modelo SF-RPSu4 de PRESENS. Este tipo de láminas contiene dos tipos de tinte que encajan en el espectro de emisión con los canales verde y rojo de un sensor CCD RGB. Cuando es excitado en 409nm, el indicador verde, N-(5-carboxipentil)-4-piperidino-1,8-naftalimida,

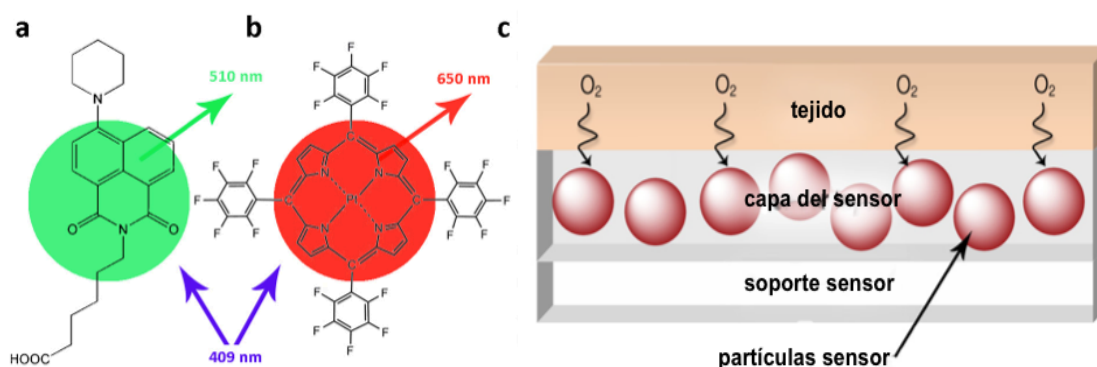


Figura 3.2. Estructuras químicas de los indicadores verde, N-(5-carboxipentil)-4-piperidino-1,8-naftalimida (a) y rojo, platino(II) meso-tetrakis-(pentafluorofenil)-porfirina (b). Diagrama del corte del sensor (c)

presenta un pico de fluorescencia en 510nm, mientras que el indicador rojo, platino(II) meso-tetrakis-(pentafluorofenil)porfirina, emite en rojo en 650nm.

El funcionamiento de estas láminas se basa en la variación de su espectro de emisión de luz dependiendo de la presencia de oxígeno, fig3.3; al ser excitada a determinada longitud de onda (LED azul, centrado en 408nm) y según la concentración de O_2 de la muestra, el indicador de oxígeno emite por fluorescencia en otra longitud de onda (en torno a 650nm, rojo). El objetivo es medir ese indicador referenciado a un valor de emisión constante e independiente de la concentración de oxígeno, también de fluorescencia (500nm aproximadamente, verde) y obtener la concentración de oxígeno de la muestra.

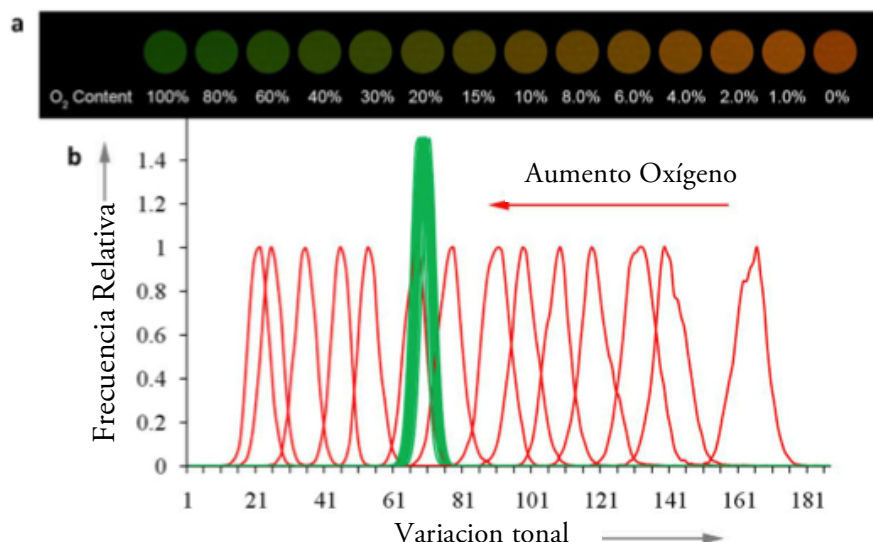


Figura 3.3. Colores aparentes de la lámina para varias concentraciones de oxígeno (a). La frecuencia relativa de los píxeles de color para las diferentes concentraciones (b).

La curva de emisión de la lámina se muestra en la fig.3.4, línea negra lisa, en la que se puede observar el pico de emisión en rojo en torno a 650nm encaja con el canal R de la cámara. De la misma forma se ve la referencia en verde emitiendo en 510nm, esta última captada tanto por el canal azul como el verde, por lo que conviene utilizar un filtro en azul.

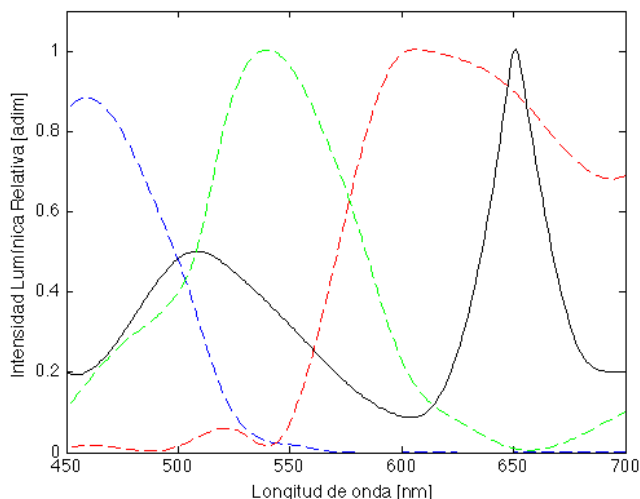


Figura 3.4. Espectro de emisión de la lámina SF-RPSu4 (negro), frente a las curvas de sensibilidad de los canales del sensor (rojo, verde y azul rayadas, RGB, respectivamente)

La intensidad de la fluorescencia del indicador rojo se ve modelada por la concentración de oxígeno en la atmósfera, y con ello la respuesta de los píxeles R del sensor de la cámara. Por el contrario, la emisión del indicador verde no se ve modificada por la presencia de oxígeno, de tal forma que los píxeles G no varían, actuando como una mera fluorescencia de referencia para el sistema.

Esta relación entre los canales R y G puede utilizarse para la predicción de la concentración de oxígeno. Comparando las dos posibilidades de [3], se aprecia una tendencia exponencial decreciente para el cociente R/G (fig.3.5a). Si bien, para su valor recíproco, G/R (fig.3.4b), la relación es lineal, pudiendo realizarse mediante una recta de ajuste. Éste último método es preciso y robusto, y más sencillo de implementar, una vez fijados los valores de ajuste de la recta.

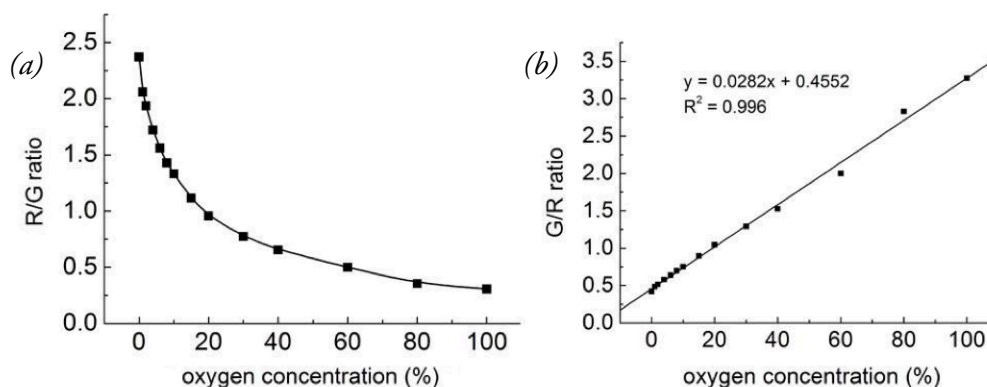


Figura 3.5. Gráfica de la dependencia de la concentración de oxígeno y el ratio R/G (a) y G/R (b).

De esta forma, dado que los valores de los canales de color medidos por la cámara son directamente proporcionales a la intensidad lumínica, su ratio se mantiene constante independientemente de la intensidad de la fuente. Si bien, es necesario comprobar la dependencia del tiempo de exposición de la cámara. Así, como se deduce de la TABLA 3.I que recoge una serie de mediciones de G/R para una misma muestra, se puede concluir que los diferentes tiempos de exposición son independientes del ratio resultante y por tanto pueden ajustarse a necesidad, siempre y cuando no se sature la imagen.

TABLA 3.I. Comparativa de Ratios G/R para diferentes tiempos de exposición.

| Tiempo de Exposición (ms) | Media por Canal | | | Ratio G/R |
|---------------------------|-----------------|-------|------|-----------|
| | Rojo | Verde | Azul | |
| 100 | 21 | 14 | 9 | 0,667 |
| 200 | 35 | 22 | 10 | 0,629 |
| 300 | 48 | 30 | 11 | 0,625 |
| 600 | 92 | 59 | 13 | 0,641 |
| 800 | 126 | 80 | 19 | 0,635 |
| 1.500 | 226 | 143 | 30 | 0,633 |
| 2.500* | 254 | 186 | 38 | 0,732 |

* Canal rojo ya saturado

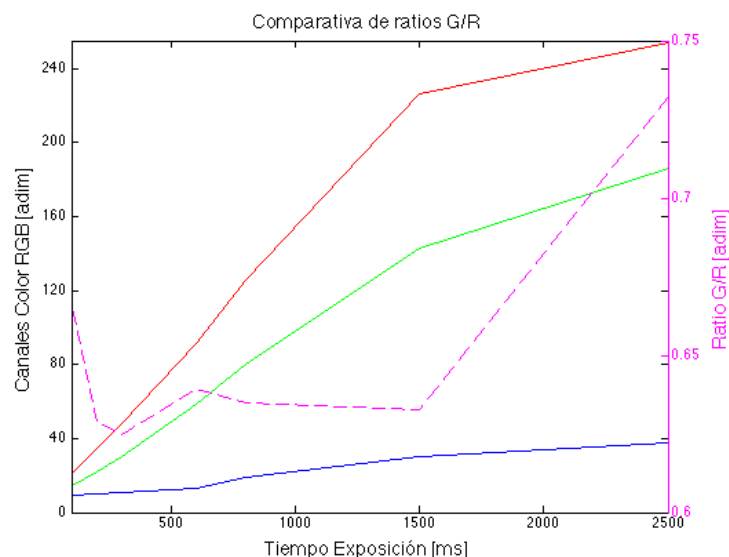


Figura 3.6. Gráfica comparativa de canales RGB y ratio G/R para diferentes tiempos de exposición. El ratio se mantiene constante hasta la saturación del canal.

En la gráfica fig.3.6 se aprecia como el ratio se mantiene constante para una misma muestra independientemente del tiempo de saturación. Únicamente al alcanzar valores de exposición de 2.500ms cuando el canal rojo satura, se altera el ratio G/R.

3.2. Análisis Espectral de la Fuente y Sensor de la Cámara

A fin de comprobar la viabilidad del sistema, se realizó un análisis espectral de la respuesta de la cámara bajo iluminación roja y verde, así como una verificación del espectro de la fuente que iba a ser utilizada finalmente en el montaje.

3.2.1. Espectro de los LED y la fuente

Para comprobar la idoneidad de la cámara, se dispusieron dos LED debidamente polarizados para lograr una emisión lo más pura posible en rojo, 650nm, y verde, 525nm, que consiguen así simular el efecto real de la fluorescencia en un experimento real. Para su

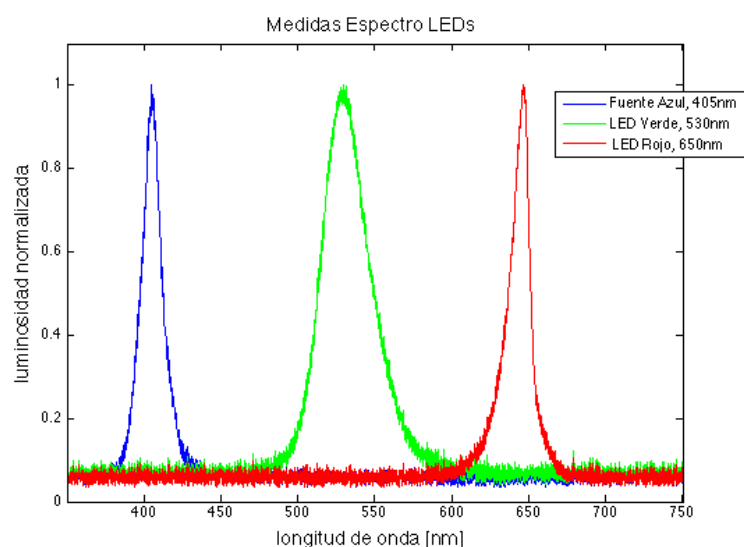


Figura 3.7. Espectro de emisión medido de los LED Rojo y Verde y la Fuente.

caracterización se utilizó un analizador de espectro óptico OCEAN OPTICS 4000.

Análogamente, también se registró el espectro de la fuente azul que sería utilizada para el experimento; ésta se caracteriza por tener una buena pureza espectral centrada en 405nm evitando así que las colas espectrales puedan contaminar el espectro en rojo y verde, como pueden verse en la fig.3.7.

3.2.2. Análisis del demosaico y filtro de imagen

Una de las partes críticas del sistema se encuentra en el algoritmo que la cámara realiza internamente para formar la imagen. Las cámaras CCD incluyen un filtro de Bayer para la captación de las componentes del espectro RGB, debido al cual, para la generación de la imagen *real* requieren de un postprocesado llamado *demosaico* (ver Anexo B).

El motivo principal del registro de los espectros RGB de emisión es comprobar si el algoritmo interno de *demosaico* respeta los espectros de color captados por el sensor CCD sin que por ello se alteren los canales de color o si simplemente hace una representación para ajustarse al ojo humano.

La cámara MIGHTEX elegida permite ser configurada para trabajar con ambos formatos de imagen, denominados *raw* (Formato de salida de cámara) y *bmp* (Imagen de Mapa de Bits). Mientras que el formato *raw* puro es el más fidedigno a la imagen captada, el *bmp* permite operar más fácil y rápidamente con imágenes y guardarlas en formatos de imagen comunes.

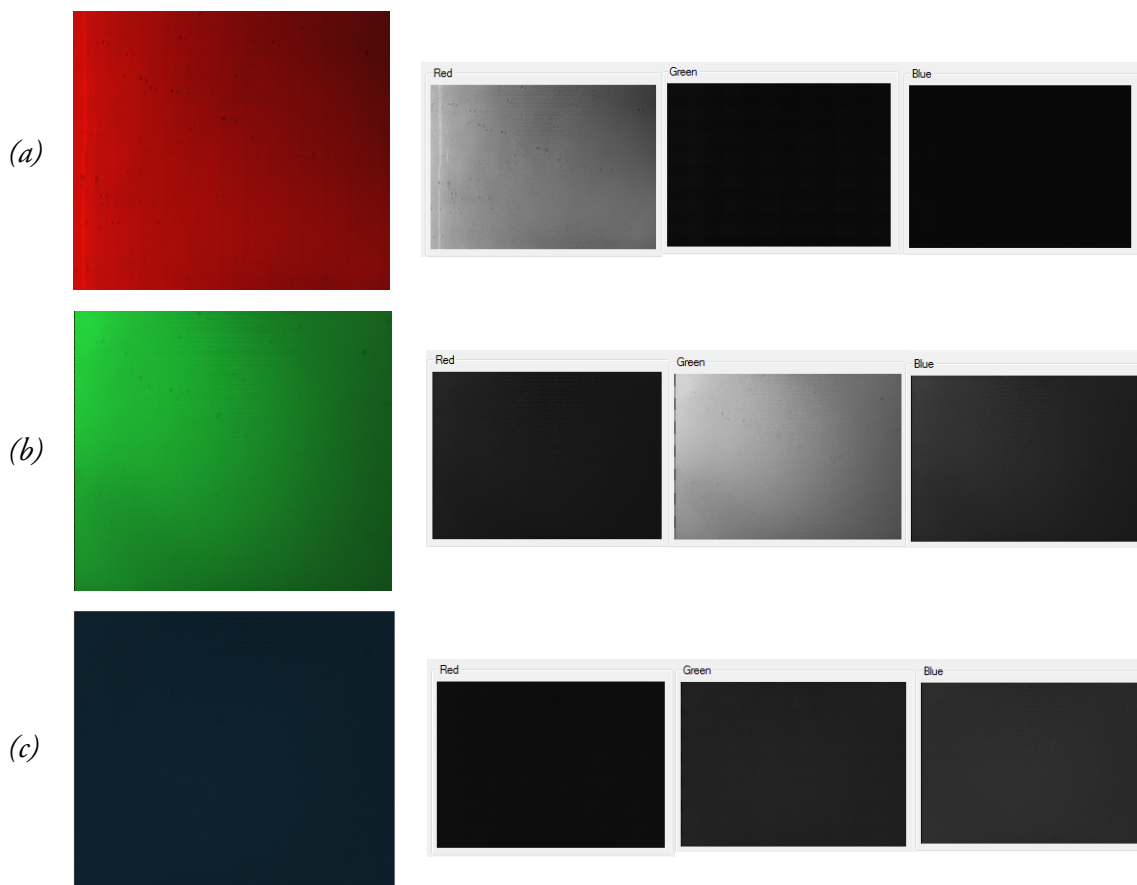


Figura 3.8. Imágenes captadas por la cámara bajo los LEDs rojo (a), verde (b) y la fuente azul (c) y sus canales de color. Como puede apreciarse, sólo aparecen iluminados los canales correspondientes para cada uno.

Así, a través de las fugas de un canal a los adyacentes se puede comprobar si los canales están lo suficientemente aislados entre sí y si el algoritmo de *demosaico* realmente respeta las componentes de color o únicamente muestra una imagen agradable al ojo humano. Las imágenes de la fig.3.8 muestran cómo se distribuyen los canales de color para los tres diferentes tipos de iluminación roja, verde y azul.

Para evitar que la iluminación azul de la fuente sature los canales de color, como se explica más adelante en el apartado 3.3, se utilizó un filtro óptico para contrarrestar las colas del espectro de la fuente; de ahí que el propio canal azul de la fig3.7 iluminado por la fuente se vea tan atenuado también.

3.3. Microscopía

Dado que los experimentos a medir se realizan a escala celular, hay que contar con un sistema de enfoque y aumento para obtener una buena imagen. Así, el sistema de microscopía ha de ser capaz de proyectar una imagen nítida sobre la superficie del sensor CCD de la cámara.

Para lograr obtener una imagen a la escala de los posibles cultivos de las pruebas se utiliza una lente de contraste de fase OLYMPUS CAchN 10x/0.25, de 10 aumentos, acoplada a un tubo opaco que fija la distancia lente-sensor.

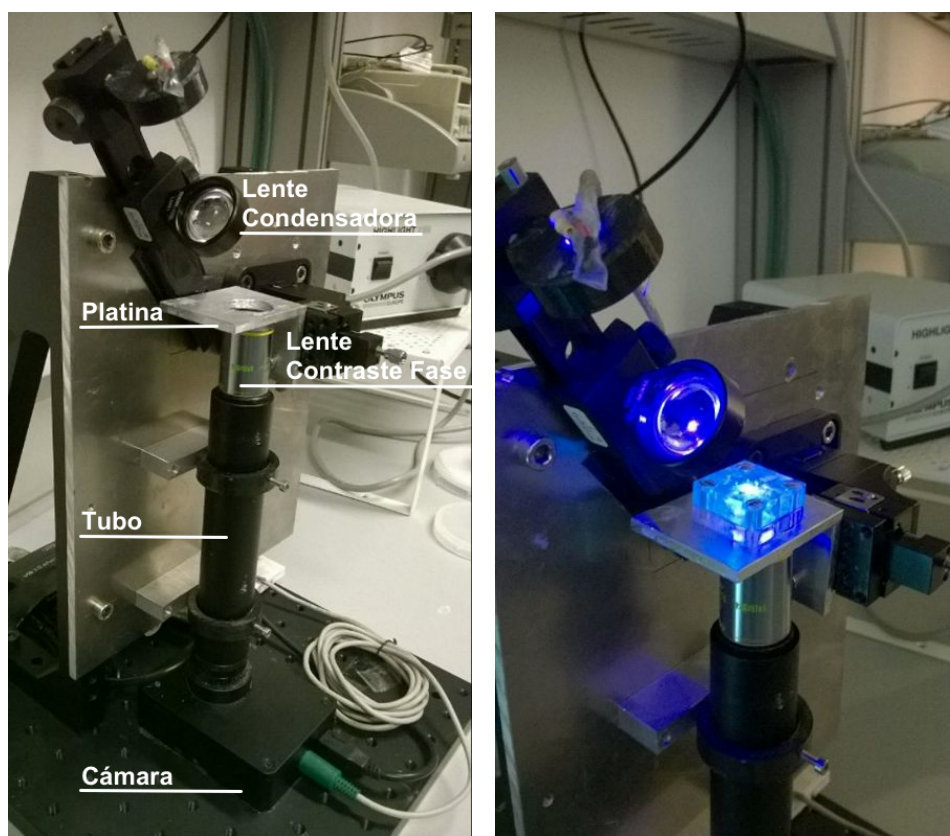


Figura 3.9. Fotografía del montaje completo y sus partes (a). Detalle del montaje con la iluminación (b)

El uso de esta lente supone el ajuste de las distancias focales del conjunto, como se indica en el diagrama mostrado en la fig.3.10, donde objetivo (negro, $f=18\text{mm}$) y ocular (azul,

$f=200\text{mm}$), se ven representadas en el mismo eje óptico sobre el que se situaría aproximadamente la encapsulado del chip de microfluídica, en S. De esta forma, el objeto S situado a una distancia mayor que el foco de la lente proyectará una imagen S', que actuará como el objeto del filtro, proyectando la nueva imagen en S''.

Entre el objetivo y el ocular, se aloja un filtro de azul EDMUND OPTICS Longpass Filter 25mm, encargado de eliminar el espectro de luz por debajo de 475nm; con ello se evita la saturación de la cámara en el canal B, que aunque no es medido directamente, su saturación puede desbordar sobre los canales R y G invalidando las medidas. La longitud de onda de corte de este filtro es lo suficientemente alta como para eliminar la luz azul sin perjudicar el espectro en las longitudes de onda del verde.

Sobre la lente se sitúa una platina de aluminio con un taladro de 2cm de diámetro aproximadamente en la que reposa el sensor. Este agujero permite captar la imagen de la parte inferior del sensor desde la cámara pero manteniendo su estabilidad sobre la platina.

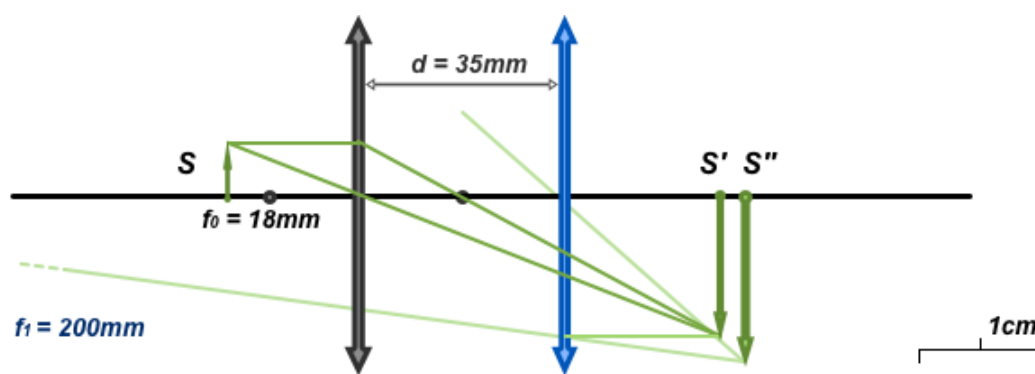


Figura 3.10. Diagrama de la disposición del objetivo (negro) y el ocular (azul). En verde, las proyecciones de rayos del objeto S y sus imágenes, S' y S''.

La platina está fijada a una base XYZ que permite el ajuste en las tres dimensiones, tanto como para afinar el enfoque de la imagen, como desplazar la el sensor en el plano de la cámara. Este soporte XYZ está fijado a su vez a una plancha de aluminio vertical y ésta a la base del montaje completo.

Seguidamente, atornillado la plancha de aluminio en línea con el tubo de la cámara hay un rail sobre el que se sujeta la fuente de luz y una lente condensadora para iluminar la muestra. El rail sólo está sujeto a la plancha de aluminio por un punto, pudiendo cambiar el ángulo de iluminación de la muestra además de la distancia de la lente y la fuente.

3.4. Cámara

Para el primer diseño del prototipo, primaba sobretodo que el dispositivo de captación a utilizar no presentase unas restricciones técnicas muy exigentes en lo referente a su sensibilidad y control por ordenador, para que pudiera usarse de forma holgada en un equipo de gama media.

La cámara contiene un sensor ICX205AK de Sony, de tipo CCD (*Charged-Coupled Device*, Dispositivo de Carga Acoplada) que presentan mejores prestaciones de relación señal a ruido y sensibilidad en detrimento de la velocidad de *scan* del array completo frente a otras como las basadas en sensores CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*,

Semiconductor Complementario de Óxido Metálico). Si bien, dado que la velocidad de captación de imagen no es un factor tan crítico como lo es la exactitud de las medidas, la opción de un sensor CCD se presenta como la mejor para este sistema.

Uno de los elementos más importantes a tener en cuenta durante la realización de los experimentos es la temperatura del ambiente donde se aloje el sistema; en condiciones de laboratorio los cultivos suelen estar a temperaturas controladas en torno a 37,5°C, lo cual puede suponer un limitante en cuanto al dispositivo. La CCE-C013-U presenta unos límites de temperatura de operación de 0-45°C y de almacenamiento de -25-85°C, por lo que encaja dentro de los márgenes de utilización.

Paralelamente, la CCE-C013-U tiene unos requisitos técnicos bastante flexibles, que consigue gracias a su motor de cámara avanzado y buffer interno, así como comunicación vía USB 2.0 y un SDK propio.



Figura 3.11. CCE-C013-U de MIGHTEX

Éste último punto también resulta decisivo a la hora de elegir la cámara. Dado que el SDK es común para toda la familia de cámaras CXX de MIGHTEX, podría substituirse la cámara por otra de mejores prestaciones para futuras aplicaciones más avanzadas sin que por ello la modificación del código de la aplicación haya de ser exhaustiva: la aplicación está preparada para que las operaciones y cálculos dependientes de los parámetros más relevantes (resolución, tiempo de exposición, etc) dependan únicamente de los valores marcados por la *.dll* en lugar de ser fijados manualmente.

La alimentación y conexión de datos de la cámara se realiza mediante un cable USB conectado a uno de sus laterales. Para la velocidad de muestreo del sensor, la conexión mediante interfaz USB puede garantizar unos 5m de cableado sin perjudicar por ello la transferencia de datos. Junto a él se ubica el conector para los pines de GPIO (*Global Purpose Input Output*) con el que poder interactuar con hardware externo.

Para disponer de mayor longitud de cable hacia el PC, la cámara está conectada a su vez a un Hub USB localizado en la parte posterior del soporte, que sirve de alimentación.

Para el resto de especificaciones de la Cámara CCE-C013-U y el sensor CCD, consultar el Anexo C.

3.5. Control de Iluminación

Dada la naturaleza prolongada de los experimentos que llevarán a cabo, para no dañar las muestras se decidió automatizar el sistema de iluminación mediante LED (LED405-02V de ROITHNER), limitándolo únicamente a los intervalos de tiempo en los que se toman las medidas reales.

El sistema de iluminación se controla mediante los pines GPIO de la cámara que ya se encuentran integradas en el SKD mediante la llamada de funciones dedicadas. Las cámaras MIGHTEX CCX cuentan con 4 GPIO a 3,3v configurables, localizadas en el conector de Din de 8 pines, como se muestra en la fig.3.12.

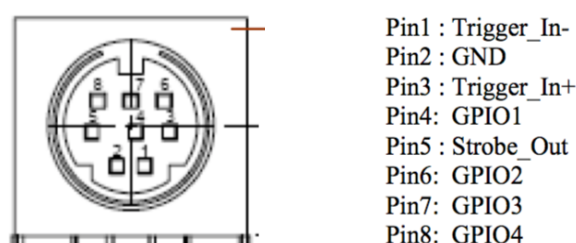


Figura 3.12. Diagrama del Conector Din de 8 pines de la cámara.

Para la activación de la fuente de luz únicamente se requiere de una única GPIO configurada como salida. Sin embargo dado que el voltaje en directa del LED azul, $V_{DD}=3,5v$, así como su corriente en directa, son mayores que los que proporciona la interfaz de salida de la cámara, se utilizó un pequeño circuito auxiliar aprovechando los +5v de uno de los puertos USB del Hub.

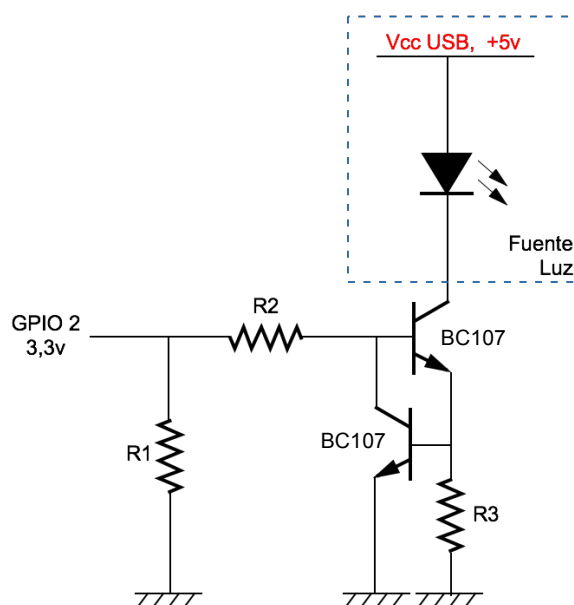


Figura 3.13. Diagrama del circuito del control de iluminación.

Para el control con la GPIO se utilizaron dos transistores de propósito general BC107 de SEME LAB a modo de interruptor dispuestos como se aprecia en la fig.3.13. Esta configuración permite un buen control de la intensidad que atraviesa el LED dependiendo de la resistencia de control R, pues la caída de voltaje en R queda fijada a 0,7v, que se

corresponde con el V_{BE} del segundo transistor. Así, si I es la intensidad que atraviesa el LED en directa cuando está encendido, ha de cumplirse (1)

$$5v > V_R + V_{CE} + V_{DD} \quad (1)$$

donde $V_{DD}=3,5v$ es el voltaje en directa del LED y V_R es la caída en la resistencia $R3$. La intensidad I viene dada por (2)

$$I = \frac{V_R}{R3} = \frac{0,7v}{R3} \quad (2)$$

Despejando para una intensidad en directa máxima del LED de 20mA, tenemos que $R3=35\Omega$ ($\approx 34\Omega$). Finalmente $R2=10k\Omega$ y $R1=100k\Omega$, que es una resistencia de *pull-down* para el circuito.

El control de estado de la GPIO así como su configuración se realizan a través del programa de la cámara, que incluye un botón para activar y desactivarla manualmente así como una opción de control automático.

Finalmente, el LED azul está sujeto a un soporte que se acopla junto con una lente condensadora de luz, que pueden desplazarse a lo largo del rail para poder variar el enfoque del haz de luz sobre la muestra.

4. Descripción del Software

La aplicación de escritorio es la encargada de efectuar el control de los parámetros de captación de imagen, capturar y almacenar los datos y permitir su exportación a diferentes soportes para su posterior interpretación.

El kit de herramientas de desarrollo (*Software Development Kit*, SDK) que incluyen las cámaras MIGHTEX permite su programación en diferentes lenguajes de programación tales como Ruby, Visual Basic, C++ y C#; todos ellas cuentan con la documentación pertinente para la lectura de datos y la configuración de la cámara antes y durante la captación de la imagen real. Junto a ella se proporcionan también las *.dll* (*Dinamic-link Library*) necesarias para los lenguajes de programación anteriormente citados, que son las encargadas de traducir las funciones de alto nivel con los registros internos del hardware de la cámara.

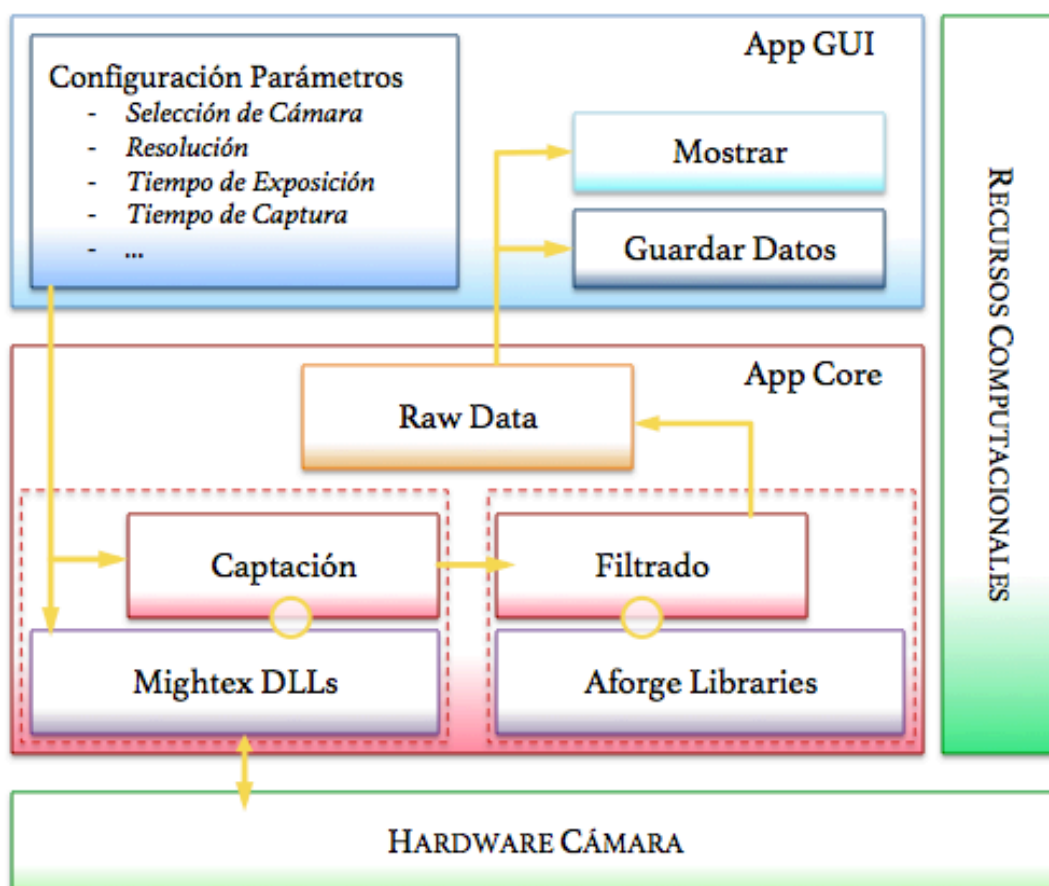


Figura 4.1. Diagrama global de la Aplicación de escritorio.

De entre todos estos lenguajes, se escogió C# para el desarrollo de la aplicación por su sencillez de interpretación y programación orientada a objetos. Al tratarse de un lenguaje compilado con una sintaxis similar a C/C++ presenta un mejor rendimiento que los interpretados, pero además cuenta con el soporte .NET de Microsoft para la elaboración de un programa de escritorio independiente y funcional con una interfaz de usuario propia.

El entorno de desarrollo escogido para trabajar en C# fue el Visual Studio de Microsoft, que junto con su plataforma de desarrollo MSDN (*Microsoft Developer Network*) cuenta

con una serie de recursos y comunidad para lograr una aplicación potente a la par que sencilla de utilizar, tanto a nivel *core* como para el desarrollo de la GUI.

Para la implementación de algunos de los filtros utilizados en el proyecto se recurrió a la librería AForge.NET (AForge.NET Framework 2008), que ya cuenta con un amplio de filtros y operaciones de imagen optimizadas para entornos C#, si bien otros de los filtros debieron ser modificados a partir de los originales para adaptarse a las exigencias concretas de este sistema.

4.1. Captación, Procesado y Filtrado de Imagen

El procesamiento global de la imagen puede dividirse en tres fases, que conforman parte *core* de la aplicación; la captación y conversión analógico-digital, que se realiza internamente en la cámara, la lectura y filtrado de datos del buffer de la cámara, y el procesamiento y extracción de parámetros de oxígeno; estas dos últimas ejecutadas por el PC.

Las operaciones realizadas internamente tales como el algoritmo de *demosaiico* se desarrollan en procesos multihilo con hardware dedicado mientras que las que se efectúan en el ordenador quedan sujetas a su capacidad de procesamiento por lo que ha de primar el uso eficiente de recursos.

4.1.1. Captación y almacenamiento en el buffer

El proceso de captación de imagen comienza con la lectura de los valores de los *sensels* RGB. Esta lectura se realiza de forma lineal, almacenando primero los registros horizontales del sensor (líneas) y posteriormente su registro vertical (columnas).

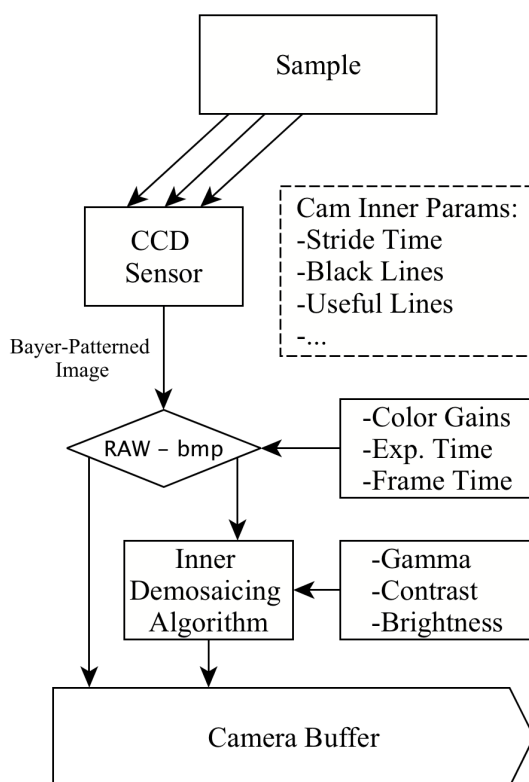


Figura 4.2. Diagrama de bloques de la captación de la imagen y tratamiento hasta el buffer de la cámara.

Durante este proceso, descrito en la fig.4.2, se pueden configurar ciertos parámetros como el ratio de salto de lectura de línea horizontal y vertical o la frecuencia de reloj de lectura de líneas, así como la ganancia analógica de los *sensels* RGB, entre otros.

Según la configuración de la cámara, tras haber finalizado la lectura de un CFA completo, se procede a la conversión y traslado de estos valores al buffer de la cámara, que variará según el modo de configuración:

- Para el modo *raw*, se trasladan estos valores en 12 bits directamente al buffer de salida de la cámara, formando un *frame*. Huelga decir que debido a la distribución del CFA la resolución de la imagen se verá mermada en un factor 2 en el canal verde y en un factor 4 para los canales rojo y azul.
- Para el modo *bitmap*, se recogen los valores del CFA y se convierten, según el algoritmo interno de *demosaiico* (Chen 1999), en una imagen RGB de 24 bits por pixel (8 por color) de la misma resolución, según los parámetros especificados por el usuario, como la gamma o el brillo. (ver Anexo X). Posteriormente, se trasladan estos valores al buffer de salida de la cámara, formando un *frame*.

Una vez que una imagen está lista para ser leída, la cámara comunica al programa que ya puede invocar al *Frame Delegate (1)* para extraerla del buffer y operar con ella.

4.1.2. Lectura y filtrado de datos de imagen

Tal y como se describe en la fig.4.3, en esta fase se comunica la parte *core* de la aplicación con la interfaz de salida de la cámara: cada vez que un nuevo *frame* está disponible en el buffer para ser leído, la cámara invoca al *Frame Delegate (1)*, FD1, indicándole la dirección de su mapa de memoria para que comience la lectura.

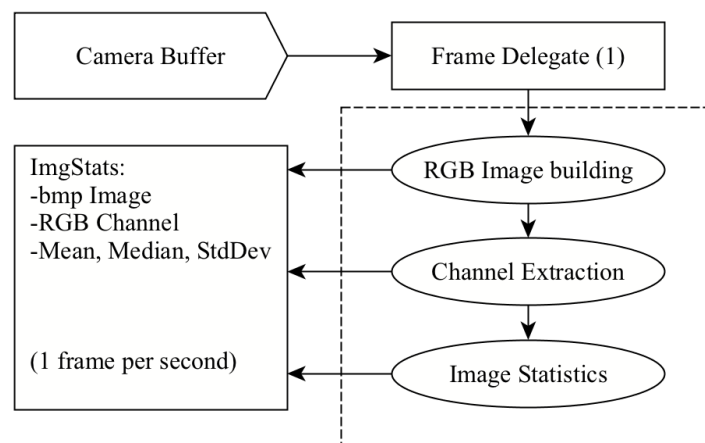


Figura 4.3. Diagrama de bloques de la lectura de datos de buffer y filtrado de imagen

El FD1 recorre las direcciones de los registros y convierte los datos de un *frame* a un tipo imagen en formato RGB usable en C#, la clase Bitmap. Éste es el tipo básico de imagen con el que se trabaja en C# y las librerías AForge, y el que permite realizar los filtrados con el mejor rendimiento posible.

Una vez generado el Bitmap RGB a 24bpp (Imagen de mapa de Rojo (8), Verde (8) y Azul (8) bits por pixel), se extraen los canales de color, así como su Media, Mediana y Desviación Estándar para almacenarlos y poder operar con ellos independientemente más

adelante, recurriendo para ello a algunas funciones proporcionadas en las librerías AForge (ver Anexo D). Estas imágenes son las que se muestran en tiempo real en la GUI.

Esta es una sección crítica de la ejecución, ya que el FD1 se trata de un proceso bloqueante que depende de la capacidad de lectura del buffer de datos de la cámara. Así, un nuevo *frame* no podrá ser leído hasta que se haya terminado la ejecución de la llamada anterior al FD1. Por tanto, la cantidad de cálculos, operaciones y copias en memoria se encuentran limitadas por la capacidad de procesamiento del equipo.

Cada ciclo de ejecución del FD1 es capaz de hacer una lectura de memoria, construcción de Bitmap RGB a 24bpp, y la extracción de los canales de color independientes, llegando a soportar aproximadamente hasta imágenes de 1.392x1.040 píxeles a 15fps, que es la resolución máxima de salida que ofrece la cámara. Primeramente, la aplicación está dimensionada para cultivos lentos de hasta incluso quince días que apenas requieren un toma de datos cada varios minutos, por lo que una actualización a 1fps para la monitorización en tiempo real de la muestra es más que suficiente, procurándose así un buen margen de seguridad.

Para procesos celulares rápidos que requieran velocidades de *frame* mayores, la aplicación también soporta la reproducción y filtrado de video; de esta forma, si la carga computacional que requiere el filtrado de la imagen sobrepasara la capacidad del ordenador, puede grabarse un video exactamente con el mismo formato y resolución para ser exportado a un archivo y realizar el procesamiento posteriormente.

Así, parte *core* de la aplicación cuenta con otro *Frame Delegate* (2), FD2, similar al que se realiza en tiempo real, encargado de la lectura y procesamiento del flujo de video desde archivo. Una vez se acceden a cada uno de los *frames* del video, el comportamiento es completamente análogo al anterior.

4.1.3. Procesado y extracción de parámetros de oxígeno

Una vez extraídos los canales de color y los parámetros de imagen se procesan y calculan los parámetros de oxígeno para un instante determinado de tiempo.

Como ya se nombró con anterioridad, debido a que el desarrollo celular se prolonga bastante en tiempo, no es necesario un cálculo exhaustivo de la concentración de oxígeno, pudiendo monitorizarse los experimentos en intervalos de varios minutos sin perder detalle. De esta forma, mientras la extracción de canales soporta una tasa de 1fps, el intervalo de procesamiento de las concentraciones de oxígeno, más intensivo, se fija a 1 *frame* cada 30 minutos, ajustable también a través de la GUI.

Cada vez que se requiere tomar una nueva concentración de oxígeno, se realiza el cociente de los *frames* correspondientes a los canales Verde y Rojo del Bitmap RGB, G/R, pixel a pixel y se almacena en una nueva imagen en escala de grises de 8 bits.

Este cociente ha de ser realizado cuidadosamente para evitar posibles operaciones conflictivas tales como la división por cero, así como respetar la máxima precisión posible que permite la escala lineal; así, para 8 bits tenemos 256 valores posibles (0-255), que se corresponden con un ratio de G/R de 0-2,55 que son los valores de pendiente que suelen obtenerse para este tipo de sensores.

Una vez hallado el ratio pixel a pixel, se extraen los parámetros de Media, Mediana y Desviación Estándar del *frame* completo, como se aprecia en la fig.4.4. Estos parámetros

son los que se emplean para el cálculo de la concentración de O_2 , tal y como se explicó en el apartado 3.1: fijado el nivel para una concentración de 0% de O_2 y posteriormente al 100% de O_2 se hallan los parámetros A y B partiendo de la media del ratio G/R, definidos como:

$$100 \overline{G/R} = A + B O_2[\%] \quad (3)$$

Cuando ya se han fijado A y B, todas las mediciones de concentración de oxígeno quedan registradas en una gráfica que se actualiza en tiempo real sobre un eje de tiempos, y que puede visualizarse en la GUI. Estos valores, pueden calcularse para la muestra actual con los controles. De la misma forma, todos estos datos de media, mediana y desviación estándar, junto con la concentración, el tiempo en el que fueron medidos y el ajuste de la recta A y B son guardados para poder ser exportados a un documento *.csv* (*Comma-Separated Values*, valores separados por coma) o un *.xlsx* (*Office Excel*).

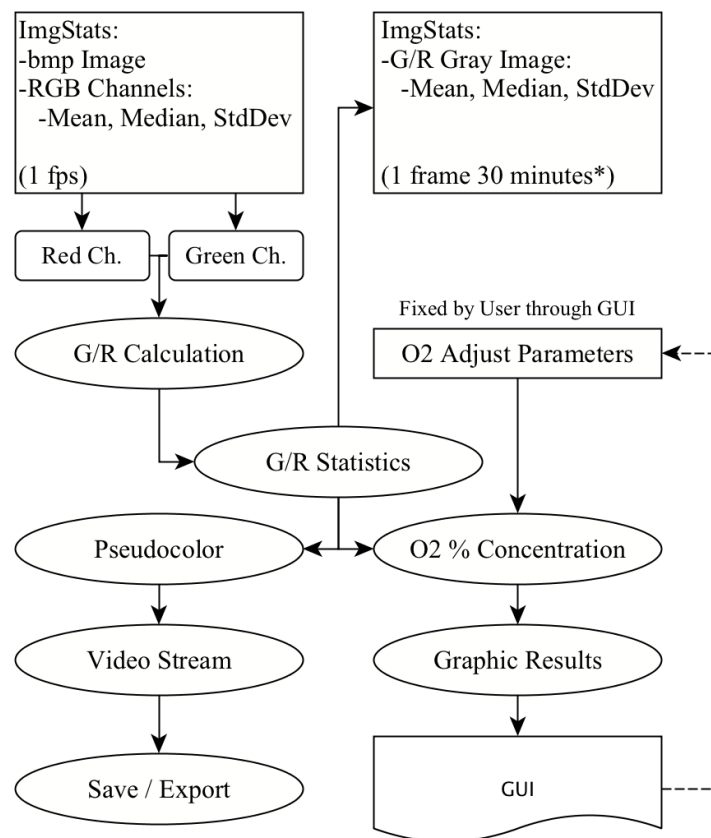


Figura 4.4. Diagrama de bloques del procesamiento y extracción de los parámetros de oxígeno.

A fin de que pueda mejorarse la visualización de la imagen G/R se realiza un proceso de remapeo de colores que a partir de la imagen en escala de grises asigna los valores RGB según las curvas de recolor mostradas en la fig.4.5a, dando lugar a una imagen en *pseudocolor* caracterizada por escala de la fig.4.5b. En ella, el valor 0 (negro) se corresponde con el RGB(0, 0, 0), el 63 con el RGB (205, 0, 0) y así sucesivamente, como se muestra en el ejemplo de la fig.4.6.

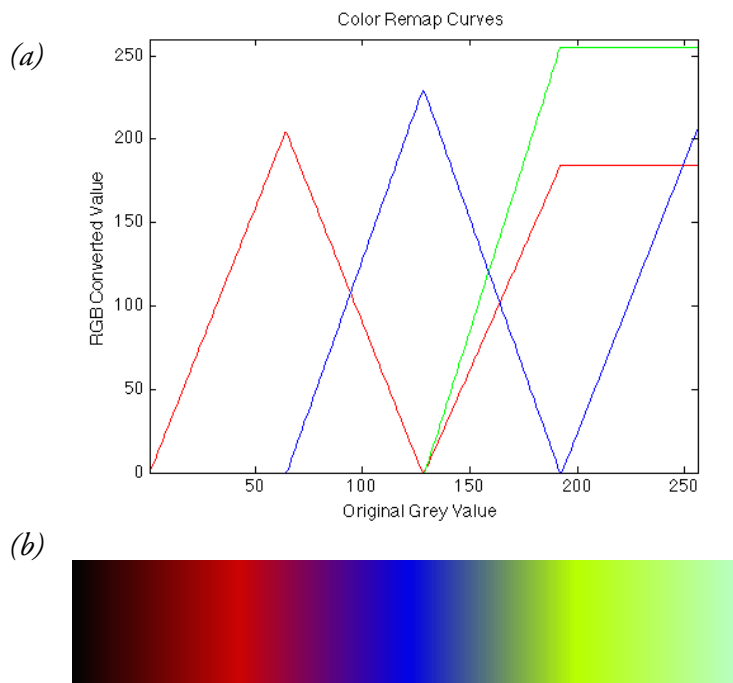


Figura 4.5. Curvas de recolor para generar la nueva imagen en pseudocolor (a). Escala resultante de aplicar las curvas sobre un gradiente de grises 0-255 (b).

Sobre imagen en *pseudocolor* se incluye también la fecha y hora con la que se corresponde así como los parámetros A y B y la concentración de oxígeno correspondiente. El flujo de imágenes resultantes también se almacena para poder exportarlo a un archivo de video que recoge la evolución de la actividad en la muestra.

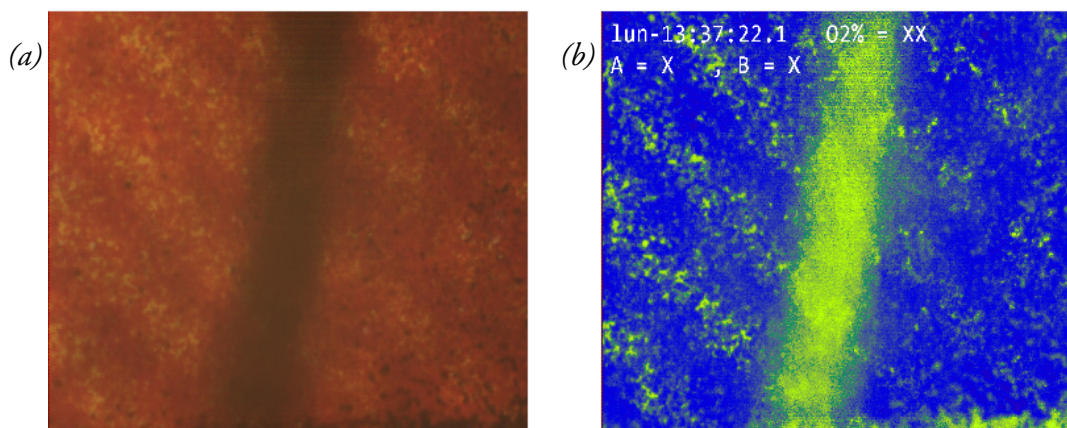


Figura 4.6. Ejemplo del recolor de imagen: Línea verde sobre un fondo rojo (a). Imagen remapeada con las curvas de recolor (b).

Cabe nombrar que cada uno de los *frames* de *pseudocolor* que se muestran en la GUI se almacena de forma automática en el directorio de guardado cada vez que se toma una medida, de forma independiente a la exportación de datos *csv* y *xlsx*. Esto asegura que, si hubiera algún problema con la toma de datos o la grabación del flujo vídeo, se conservarían todas las capturas recogidas hasta la fecha, evitando la pérdida de datos.

4.2. Interfaz Gráfica de Usuario (GUI)

La Interfaz Gráfica de Usuario (GUI) es el medio con el que se configuran los parámetros de ajuste del sistema como lo son la selección de cámara, su tiempo de exposición, ganancias de color o rutas de carga y exportación de archivos, entre otros.

La GUI está diseñada utilizando los controles del tipo *Form* que ofrece el Visual Studio, algunos simples como cajas de texto, y botones (.NET Framework 3.5) y otros más avanzados como gráficas dinámicas (.NET Framework 4.0).

Lo primero en abrirse al cargar la aplicación es la ventana principal, figs.4.7 y 4.8; desde ella, se acceden a otras que contienen información adicional como son los histogramas de canales RGB o un *frame* visionado a mayor tamaño para hacer el ajuste del enfoque, entre otras, como se muestra en la fig.4.9.

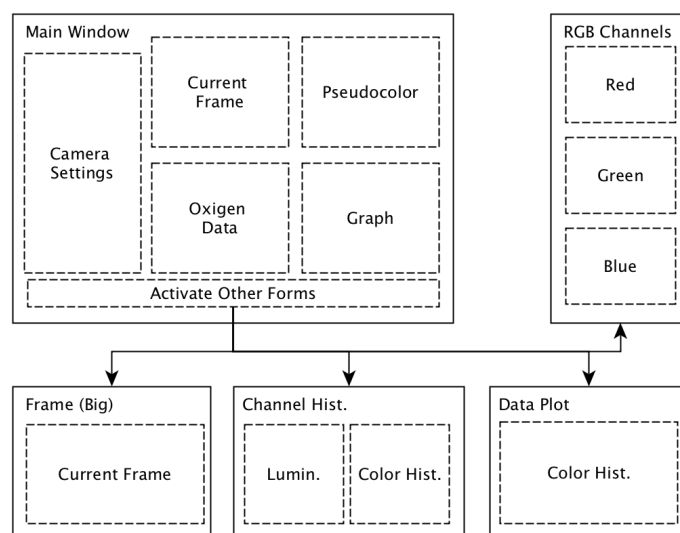


Figura 4.7. Diagrama de bloques de la GUI.

4.2.1. Ventana Principal

La ventana principal de la aplicación concentra en su panel izquierdo la mayoría de los controles de ajustes de la cámara, así como las rutas de guardado para exportar los datos, los visualizadores de imagen del *frame* de la cámara, la imagen de *pseudocolor*, la los parámetros y la gráfica de concentración de O₂ en tiempo real y los controles de iluminación del LED.

Controles de la cámara:

- [1] Selección de Cámara: permite seleccionar con qué cámara de las compatibles conectadas al ordenador se va a trabajar. Una vez seleccionadas, se muestra el Modelo y Número de serie.
- [2] Motor de la cámara: inicializa el motor de captura de tramas de la cámara de entre las resoluciones disponibles (1.392x1.040, 1.392x520, 1.392x344 y 1.392x256). También muestra los parámetros de *fps* y Tiempo de exposición.

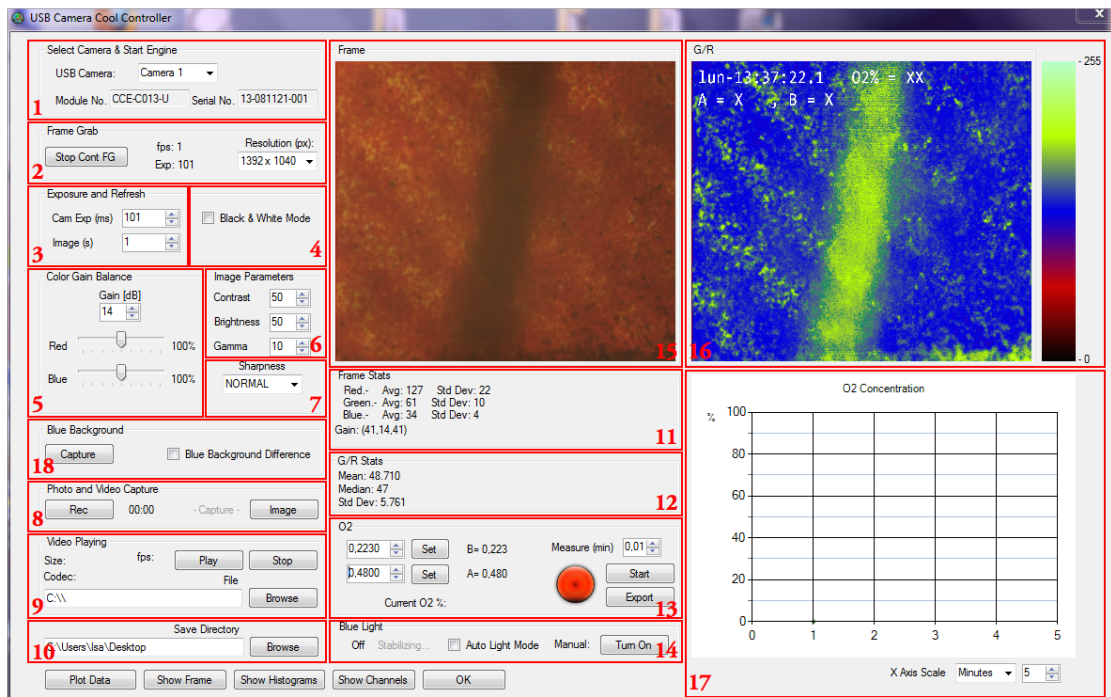


Figura 4.8. Ventana Principal de la Aplicación.

- [3] Tiempo de Exposición y Refresco: Permite ajustar el tiempo de exposición de la cámara (1~2.000ms), así como el tiempo de refresco de los *frames* que se muestran en la aplicación (1~10s).
- [4] Modo Blanco&Negro: selecciona el modo Blanco y negro de la cámara. En el modo B&N los *frames* se capturan en escala de grises, esto es, con sus tres canales RGB iguales.
- [5] Balance de Ganancias: permite la configuración de las ganancias analógicas de la cámara para calibrarla al comienzo y hacer el ajuste de blancos si fuera necesario. Consta de dos partes, la Ganancia Global de los canales RGB por igual y los ratios de rojo y Azul, que indican qué porcentaje de ganancia respecto a la global reciben respectivamente.
- [6] Parámetros de Imagen: el Contraste, Brillo y Gamma, son parámetros que intervienen en la conversión *raw* a *bitmap*. Sus valores por defecto se corresponden con una conversión lineal normal, si bien pueden modificarse si es necesario.
- [7] Afilación: cambia entre los modos de afilación de la imagen modificando así el comportamiento de los filtros de suavizado de imagen internos de la cámara. Por defecto sin filtrado.
- [8] Captura de Foto y Video: son los controles de grabación de video y captura de imagen para su postprocesado.
- [9] Reproducción de Video: a partir de clips de video previamente grabados permite su análisis como si estuvieran siendo captados en tiempo real. Se muestra la ruta de archivo, así como los controles de Reproducción, Pausa y Paro.
- [10] Directorio de Guardado: Especifica la ruta donde se guardan todos los archivos generados por la aplicación, desde los flujos de video e imágenes hasta los archivos de datos exportados.
- [11] Estadísticas de Trama: muestra los valores de Media, Mediana y Desviación Estándar de los canales RGB de la trama actual.

- [12] Estadísticas G/R: muestra los valores de Media, Mediana y Desviación Estándar de la última imagen G/R calculada.
- [13] Parámetros de O₂: desde aquí se capturan los valores medios de G/R a concentraciones de 0 y 100% de O₂ para formar la recta de ajuste. Desde aquí se inicializa y para la captura de datos de oxígeno y se modifica el intervalo de toma de medidas. Permite introducir los parámetros A y B manualmente de otros chips ya caracterizados. Incluye también un indicador de paro-marcha.
- [14] Iluminación: control de la GPIO conectada a la fuente de luz azul. Tiene modo automático y manual.
- [15] Pantalla de *frame*: el *frame* actual.
- [16] Pantalla de *pseudocolor*: la imagen G/R con en *pseudocolor*. A su derecha se muestra una escala de correspondencias de valores y colores.
- [17] Gráfica de O₂: muestra en tiempo real las concentraciones de oxígeno calculadas a partir de A, B y el último G/R. Permite el escalado del eje temporal en minutos, horas, días y semanas.
- [18] Imagen de fondo: control para poder capturar una “imagen de fondo” que sustraer del *frame* actual, de cara a futuras revisiones de la aplicación, con vistas a la reducción de ruido. Actualmente deshabilitado.

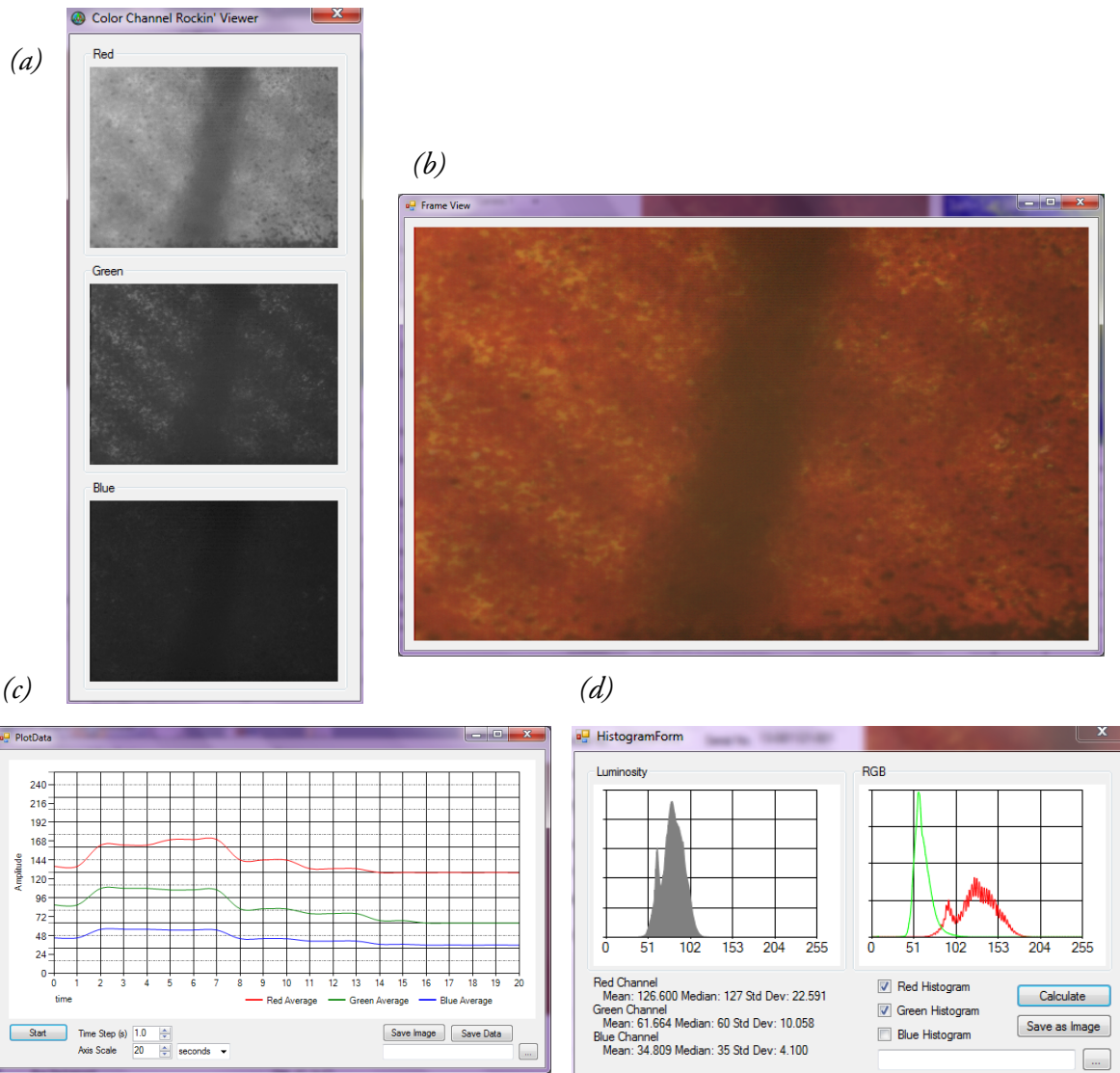


Figura 4.9. Ventanas secundarias de la aplicación: de Canales RGB (a), de Frame (b), de Gráficas de Datos (c) y de Histogramas (d).

4.2.2. *Ventana de Canales RGB*

En la ventana de Canales RGB se muestran las componentes de color correspondientes a cada canal, en tres imágenes separadas que se actualizan en tiempo real cada segundo con un nuevo *frame*. De esta forma pueden compararse más fácilmente las relaciones de color en diferentes zonas del cultivo más fácilmente junto con la imagen RGB completa.

4.2.3. *Ventana de Frame*

La ventana de *frame* es una ampliación de la miniatura que se muestra en la Ventana Principal. Al mostrar esta ventana se facilita un ajuste más fino a la hora de hacer el enfoque de la lente y apreciar mejor otros detalles.

4.2.4. *Ventana de Gráficas de Datos*

Esta ventana contiene otra gráfica dinámica que registra los valores de media de los canales RGB por separado, para poder realizar procesos de calibración de forma más sencilla.

La gráfica dinámica dispone de los controles de ajuste de los ejes a pequeña y gran escala, además de ofrecer la posibilidad de exportar los datos a formato *.xlsx* y *.csv* para su uso posterior.

4.2.5. *Ventana de Histogramas*

En la ventana de histogramas se muestran dos gráficas, correspondientes a la distribución de valores de luminosidad e histogramas de canal de color. Con ellos puede comprobarse si el sensor está saturado por recibir demasiada luz, o cómo se distribuyen los valores de los canales RGB.

Dentro de esta ventana se encuentran también los controles para poder exportar los datos capturados en las gráficas, tanto en formato de imagen *.bmp* como en *Excel*, *.xlsx*.

5. Medidas Experimentales

De cara a la realización de medidas experimentales reales, se intentó simplificar el diseño de la aplicación para que sea lo más intuitiva posible a la hora de calibrar el sistema al comienzo de un experimento.

5.1. Calibración de la Cámara

Antes de realizar un cultivo real, es necesario comprobar y calibrar la cámara para las concentraciones de 0 y 100% de oxígeno, y hallar así los valores de A y B de ajuste de la recta. Los valores obtenidos quedan almacenados en la aplicación o pueden volver introducirse posteriormente de forma manual, permitiendo así disponer de la caracterización de varios chips simultáneamente.

Para una comprobación del funcionamiento del sistema, se utilizó una lámina de acetato transparente iluminada con luz blanca, sobre la cual se pintaron dos secciones que iban desde el rojo al verde, emulando el patrón de fluorescencia del sensor en concentraciones del 0% al 100% de oxígeno respectivamente.

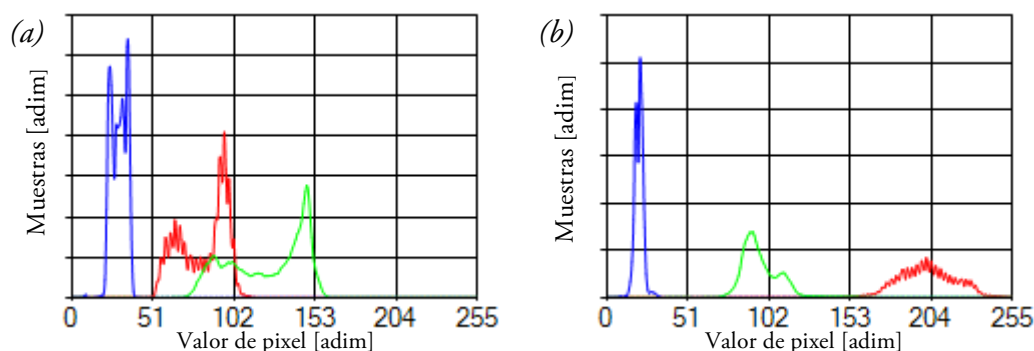


Figura 5.1. Histogramas de los Canales Rojo, Verde y Azul para las imágenes de la lámina de acetato verde (a) y roja (b). La presencia de componente azul se debe a la mezcla de los tintes utilizados.

Durante el proceso de calibración, se obtuvieron unos valores de ajuste de $A = 0,4796$ y $B = 1,0132$. A diferencia de un sensor real en el que el indicador verde permanecería constante durante todo el rango, en esta simulación ambos indicadores, verde y rojo, se desplazan para las concentraciones de 0~100% como se aprecia en los histogramas de la fig.5.1, debido a la disposición del patrón dibujado sobre la lámina. Sin embargo, este caso sirve para ilustrar cómo evolucionaría el ratio G/R en un experimento con un cultivo real.

Fijados ya los valores de A y B, se realizó un barrido sobre la superficie de la lámina, sirviéndose para ello de la base móvil XYZ; desplazando la platina de forma longitudinal al patrón sobre la lámina pintada, se emuló así una disminución de la concentración de oxígeno sobre una muestra.

Así, durante doce minutos aproximadamente, se fue recorriendo paulatinamente el patrón pintado recogiendo los datos de la evolución de forma análoga a la que se llevaría a cabo con un cultivo real, con un intervalo de toma de muestras de cinco segundos. Finalizada la simulación, se exportaron tanto el vídeo como los datos de las medidas.

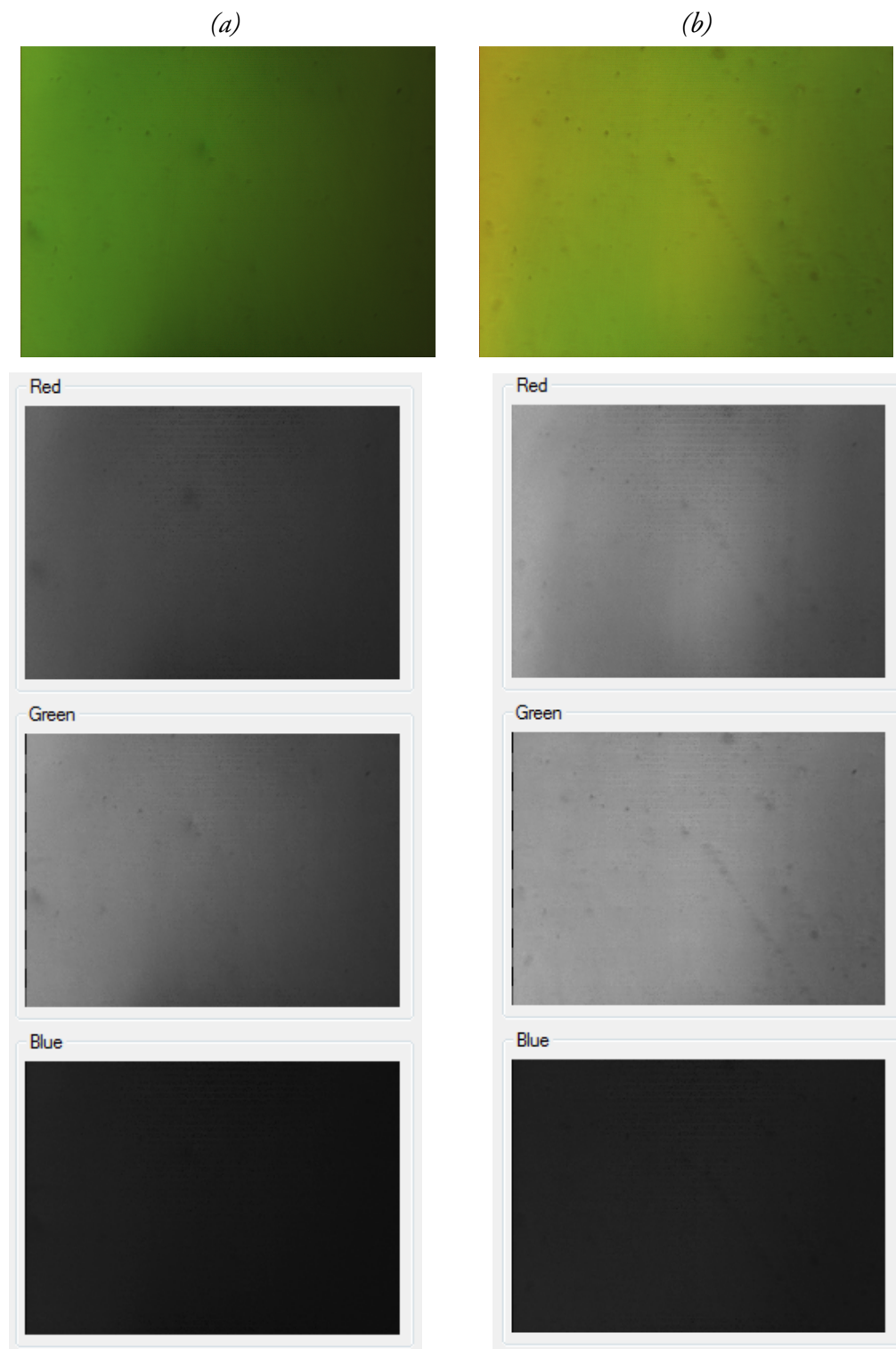


Figura 5.2. Imágenes RGB (arriba) y canales de color (abajo) de la lámina de acetato pintado para una concentración de oxígeno simulada equivalente del 100% (a) y del 70% (b).

En la fig.5.2 se aprecia la evolución decreciente de la concentración de oxígeno equivalente simulada por el acetato; a medida que la parte verde del patrón se desplaza hacia el borde derecho de la captura, el porcentaje disminuye en consonancia. Para hacerse una idea de las dimensiones del patrón pintado y de la propia muestra, cabe destacar que la

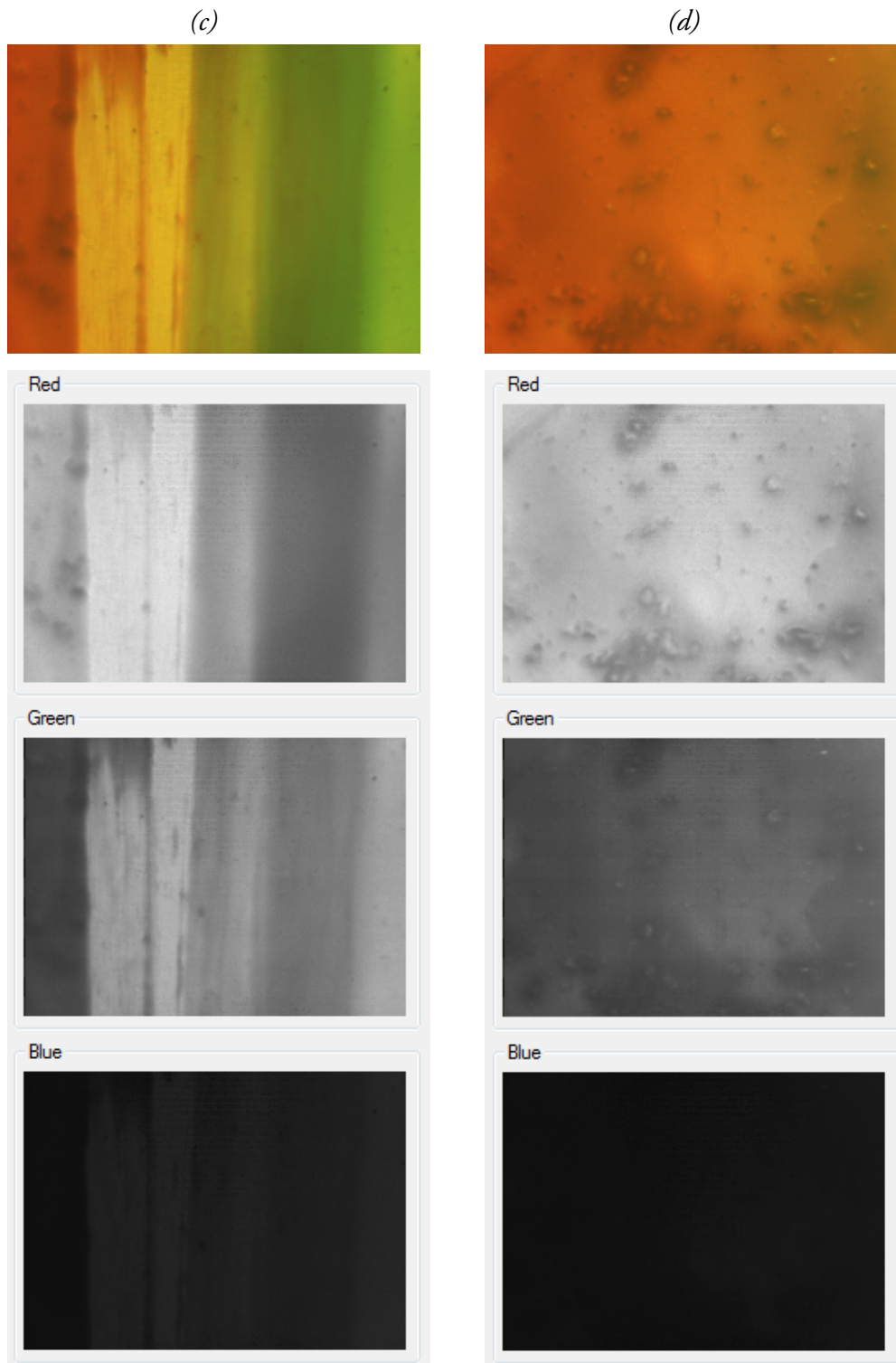


Figura 5.2.(continuación) Imágenes RGB (arriba) y canales de color (abajo) de la lámina de acetato pintado para una concentración de oxígeno simulada equivalente del 38% (c) y del 0% (d).

superficie de la imagen capturada es de aproximadamente de $800 \times 700 \mu\text{m}$. En las capturas de la misma figura se aprecian unas imperfecciones debidas a la irregularidad del patrón pintado sobre la lámina de acetato, que dan una mejor idea de cómo se comportan las componentes de color Rojo, Verde y Azul.

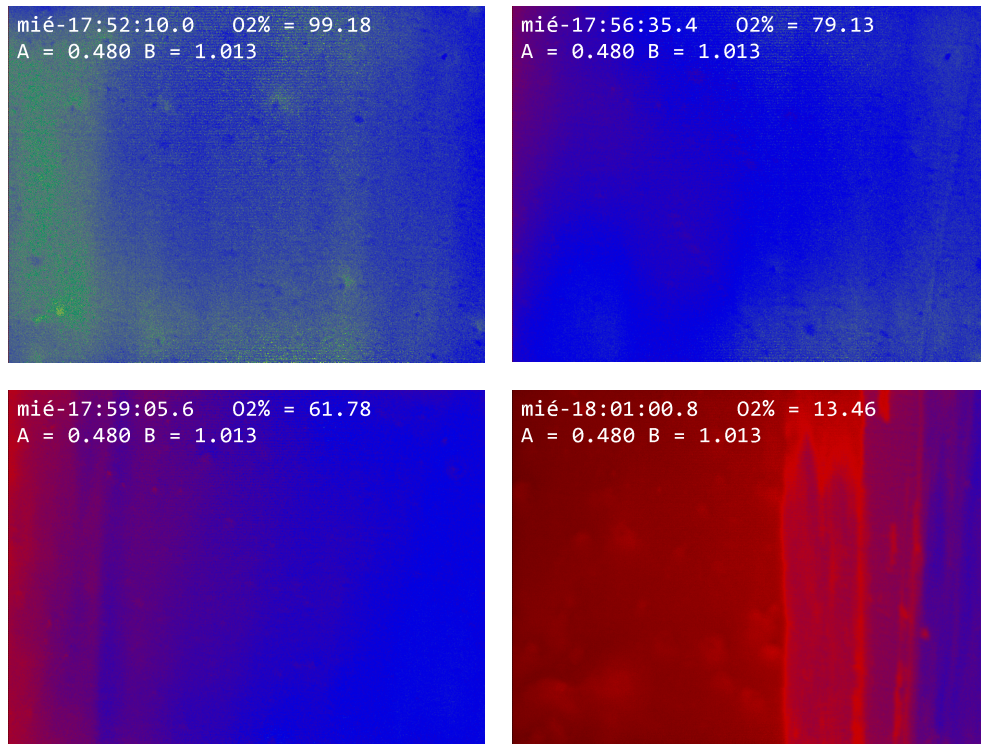


Figura 5.3. Imágenes de pseudocolor de capturas de diferentes posiciones del acetato para diferentes concentraciones de oxígeno equivalentes.

Análogamente, en la fig.5.3 se muestran las imágenes en *pseudocolor* para cuatro concentraciones. Gracias a la utilización del remapeado de color se aprecian mucho mejor los contrastes entre diferentes zonas de la captura.

Finalmente, en la fig.5.4 se muestra una gráfica que representa la evolución de las concentraciones equivalentes de oxígeno frente al tiempo de simulación.

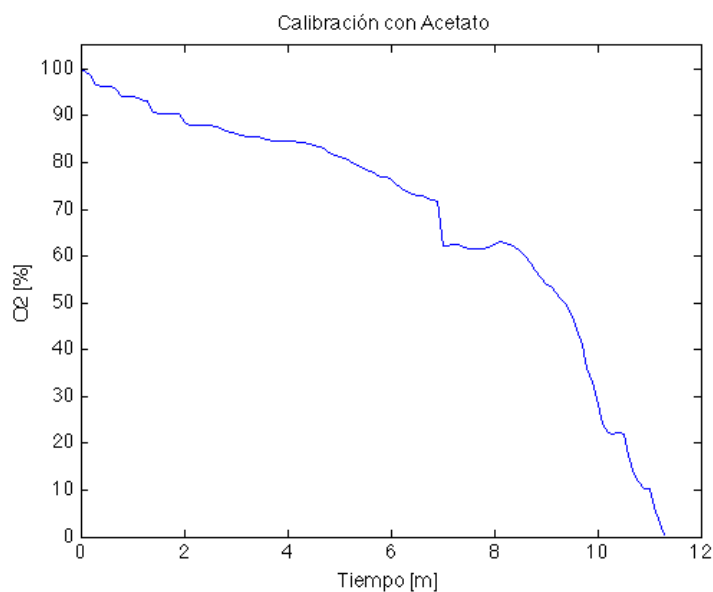


Figura 5.4. Gráfica de la evolución temporal de la concentración de oxígeno equivalente simulada.

5.2. Cultivo de células

Para la comprobación real del funcionamiento del sistema se realizó un cultivo real en condiciones de laboratorio en las instalaciones del i3A (Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón), que forma parte de una de las líneas de investigación del GEMM y CIBER-BBN (Centro de Investigación Biomédica en Red, Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina).

El objetivo de este experimento era analizar el consumo de oxígeno de una línea celular estable de Glioblastoma U-251. El glioblastoma es un tipo de tumor cerebral compuesto por células astrocíticas, encargadas de realizar diversas actividades nerviosas. Para ello, se introdujo dentro del chip un cultivo de estas células astrocíticas tumorales U-251 embebidas en un hidrogel de colágeno a 1,5mg/ml.

Una vez preparado el chip, la población de células iría consumiendo paulatinamente el oxígeno de la muestra, partiendo desde un nivel de 100% de O_2 hasta que se creyera conveniente. El montaje se introdujo dentro de una cámara de cultivo de temperatura controlada (37,5°C) durante siete días, monitorizado en todo momento por el ordenador que ejecutaba la aplicación. Por su parte, el chip había sido caracterizado previamente obteniendo unos valores de $A = 0,882$ y $B=0,220$.

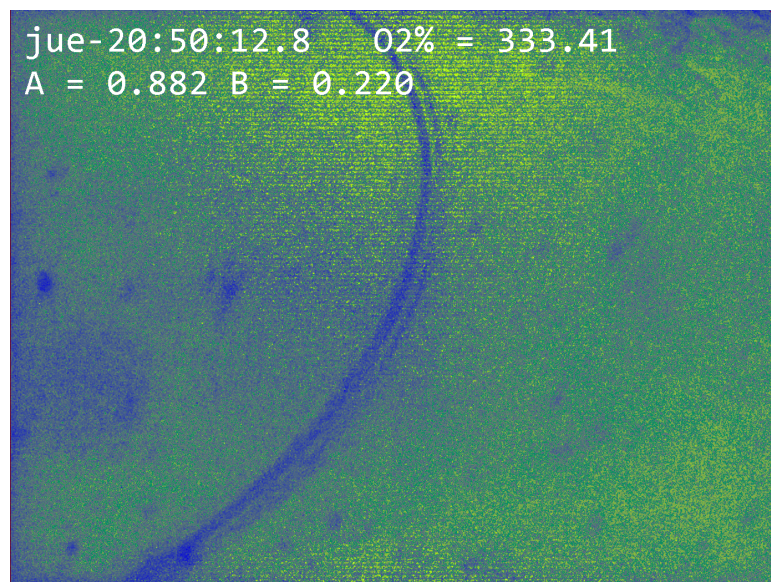


Figura 5.5. Imagen en pseudocolor de la burbuja de aire en la muestra.

Sin embargo, debido a un fallo de mecanización, quedó un poro en la carcasa permitiendo que entrara una burbuja de aire en la muestra y alterando consigo las medidas de oxígeno, fig. 5.5. Debido a esto, no se pudieron extraer resultados útiles del experimento, quedando pospuesto para líneas de investigación futuras.

6. Conclusiones

El objetivo de este proyecto es el estudio y diseño de un sistema de medición de concentración de oxígeno en células y tejidos, mediante el uso de técnicas de fluorescencia y procesado y captación de imagen. Al fin del mismo, se ha logrado un primer prototipo funcional, que si bien puede ser susceptible de diversas mejoras en el futuro, consigue realizar las mediciones para el cual fue diseñado.

Los experimentos a escala microscópica destacan por ser especialmente delicados en cuanto a su manipulación y estudio; de ahí que durante todo el diseño del sistema se haya intentado maximizar la precisión del procesado de datos para lograr unos resultados lo más ajustados a la realidad, sin comprometer por ello el rendimiento general del sistema. En este mismo aspecto también ha sido de vital importancia una búsqueda cuidadosa de los elementos que componen el sistema; han de poder operar dentro del rango bajo las condiciones a las que se van a ver sometidos en un ambiente de laboratorio, que si bien no son excesivamente exigentes para este caso, sí que implican una elección meticulosa.

Otro de los aspectos clave que motivaron este proyecto fue lograr la automatización de un sistema que hiciera uso de técnicas de medición hasta la fecha realizadas de forma manual; la toma de muestras automática supone un gran avance en campos del ámbito de la investigación, pues supone una optimización tanto de personal como de recursos.

Por otra parte, el diseño de una interfaz gráfica sencilla y que pueda ser manipulada con fluidez y que respondiera en todo momento se ha presentado como otro aliciente muy relevante durante el transcurso del proyecto. El uso del clásico interfaz de botones y ventanas de una aplicación de escritorio, sumado con la posibilidad de exportar una gran cantidad de datos tanto procesados como sin procesar, hacen que la aplicación pueda ser utilizada sin tener que conocer su funcionamiento interno.

Finalmente, se realizaron las pruebas pertinentes para la verificación de su funcionamiento, comprobando que el prototipo es válido para su uso bajo condiciones de laboratorio.

7. Líneas de investigación futuras

Este proyecto supone el primer prototipo y punto de partida para investigaciones de carácter bioquímico que puedan relacionarse directa o indirectamente con el comportamiento del oxígeno. El primer aspecto a tener en cuenta para líneas futuras es su uso en condiciones de laboratorio reales que permitan llevar a cabo otras modificaciones para que el diseño deje de ser un prototipo y se convierta en un sistema completamente operativo y funcional.

La mejora del sistema de microscopía, substituyéndolo por un montaje en T con filtros dicróicos en el que la fuente de luz no ilumine directamente el sensor de la cámara, la posibilidad de incluir una óptica de más aumentos o la utilización de más de una fuente de luz para localizar otro tipo de marcadores espectralmente compatibles con éste son algunas de las mejoras posibles que se prevé llevar a cabo en un futuro; la medición no sólo del oxígeno sino de otros parámetros importantes como el pH se presentan como una línea de diseño e investigación prometedora.

En cuanto al procesado e imagen se refiere, se plantea también la mejora de los algoritmos de cálculo de concentración, como puede ser la introducción del seguimiento y conteo de células o la selección de áreas de interés en los cultivos; se baraja también la creación de un asistente de instalación para usuarios que pueda aportarle un cariz más simplificado sobretodo a la hora de migrar el sistema de un lugar a otro fácilmente.

8. Bibliografía

- [1] Dragavon, Joseph Michael. «Development of a Cellular Isolation System for Real-Time Single Cell Oxygen Consumption Monitoring.» Washington: Universidad de Washington, 2006.
- [2] Hajimohammadi, Mahdi, Hamid Mofakham , Nasser Safari , y Anahita Mortazavi Manesh . «Highly efficient conversion of aldehydes to carboxylic acid in the presence of platinum porphyrin sensitizers, air and sunlight.» *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* , nº 16 (2012): 93–100 .
- [3] Meier, Robert Johannes. «Luminescent Single and Dual Sensors for In Vivo Imaging of pH and pO₂.» Regensburg: Facultad de Química y Farmacia, Univ. Regensburg, Mayo de 2011.
- [4] Chen, Ting. «A Study of Spatial Color Interpolation Algorithms for Single-Detector Digital Cameras.» Stanford: Universidad de Stanford, Invierno de 1999.
- [5] AForge.NET Framework. *AForge.NET Framework*. Editado por Andrew Kirillov. 2008. <http://www.aforgenet.com/framework/> (último acceso: Diciembre de 2013).
- [6] Imatest. *Raw Files*. <http://www.imatest.com/docs/raw/> (último acceso: Enero de 2014).
- [7] Microsoft. *Microsoft Developer Network, MSDN*. msdn.microsoft.com (último acceso: 2014).
- [8] Wikipedia. *Demosaicing*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Demosaicing> (último acceso: Enero de 2014).
- [9] —. *Raw Image Format*. http://en.wikipedia.org/wiki/Raw_image (último acceso: 2014 de Enero).

9. Planificación

La estructuración del trabajo a realizar durante el intervalo de tiempo fue la que sigue:

TABLA 9.I. *Distribución del tiempo de trabajo por semanas.*

| | Febrero | | | | Marzo | | | | Abril | | | | Mayo | | | | Junio | | | |
|-------------------------------------|---------|----|----|----|-------|----|----|----|-------|----|----|----|------|----|----|----|-------|----|----|----|
| Tareas | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 | S1 | S2 | S3 | S4 |
| Estudio bibliográfico | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Estudio de cámara y LEDs | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Diseño Software Cámara | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Validación Software y Calibración | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Experimentos con cultivos celulares | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Escritura de Proyecto | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

- Estudio bibliográfico: Documentación y Búsqueda de cámaras.
- Estudio de Cámara y LEDs: Diseño de algoritmos de filtrado en MATLAB y comprobación. Caracterización y validación de la cámara y fuente. Definición de la GUI.
- Diseño Software Cámara: Diseño de la aplicación y de la GUI. Implementación de los algoritmos de filtrado.
- Validación Software y Calibración: Depuración y testeo de la aplicación. Calibración de la cámara con casos controlados.
- Experimentos con cultivos celulares: Experimento en condiciones controladas de laboratorio
- Escritura de Proyecto: Redacción de la Memoria del Proyecto.

Quedando así una distribución de horas como se muestra a continuación:

- Documentación: 15 horas.
 - Diseño y Calibración: 240 horas.
 - Redacción de la Memoria: 45 horas.
- Total: 300 horas.

Anexo A. Representación de Color. Filtro de Bayer.

Representación de Color

Las imágenes captadas por las cámaras fotográficas siguen el modelo RGB para la representación del color. Según este modelo cada color se descompone como una adición de los tres colores primarios de las cuales hereda su nombre, a saber, Rojo, Verde y Azul (en inglés, *Red*, *Green*, *Blue*).

La elección de estos colores primarios no es casual, sino que se ajusta a la fisiología del ojo humano. La captación de color dentro del ojo se realiza en la retina, sobre la cual se encuentran diseminadas dos tipos de células que se encargan de la representación de la *crominancia* y de la *luminancia* de las imágenes, respectivamente, los conos y bastones.

Así, mientras los bastones son los utilizados para la visión *escotópica* en condiciones de baja luz, los conos se encargan de la visión *fotópica*, esto es, la distinción del color de la imagen, según sus tres posibles pigmentos fotosensibles, rojo, verde y azul, los cuales ya se han nombrado anteriormente.

Para una representación de color verdaderamente fidedigna se necesitaría un espacio tridimensional, pero dejando de lado la luminancia del color, se fijó el diagrama del espacio de cromaticidad CIE_{xy} 1931 (fig. I.1)

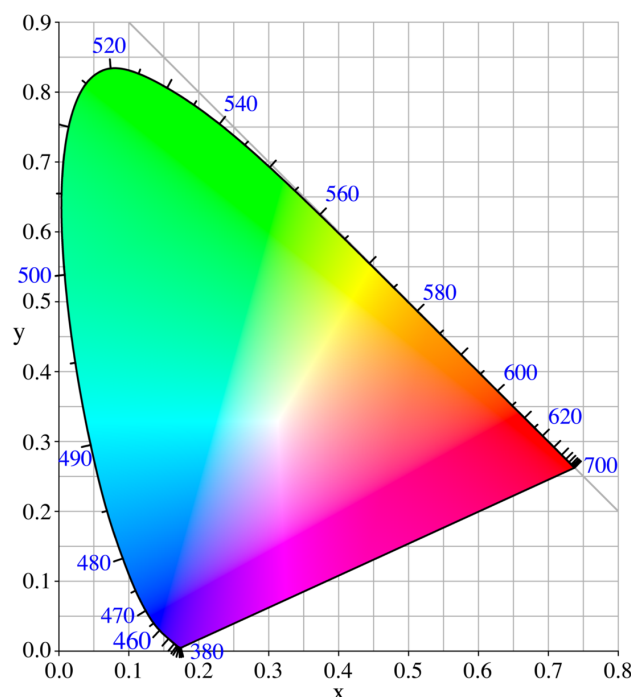


Figura A.1. Espacio de Cromaticidad CIE_{xy} 1931.

Según este diagrama, la cromaticidad de cualquier color puede representarse mediante la combinación de dos parámetros x e y , que se derivan de los valores triestímulo de representación del color. Según este diagrama, el límite superior representa los colores monocromáticamente puros (*spectral locus*), correspondientes a una única longitud de onda que puede ver el ojo humano.

Así, el resto de colores vendría dado como una combinación lineal de sus valores.

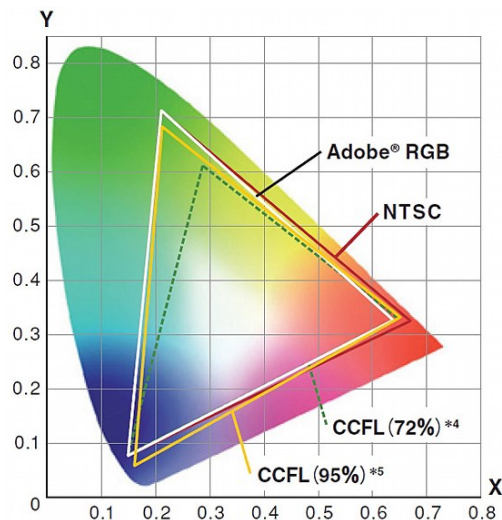


Figura A.2. Diferentes gamas según los espacios de color de diferentes sistemas de colorimetría.

Cabe nombrar que el tamaño de un determinado espacio de color vendrá limitado por la pureza de los propios generadores RGB. Esto es, una pantalla LCD por ejemplo, su espacio de color sólo podrá representar el abanico de colores (gama) que encierre el triángulo de la respuesta espectral de sus fotodiodos en rojo, verde y azul, y que puede ser mayor o menor que el de la cámara que captó la imagen original.

Filtro de Bayer

La mayoría de las cámaras fotográficas utilizan un filtro de Bayer (CFA) sobre su sensor. El filtro o mosaico de Bayer es un array de pequeños filtros tricolor que fue patentado en 1976 por Bryce Bayer, cuya misión es reorganizar los propios pixels del sensor en dos grupos: elementos sensibles a la luminancia y elementos sensibles a la crominancia; de esta forma se consigue que se pueda representar una imagen sin necesidad de recurrir a más de un sensor para la captación de sus diferentes componentes.

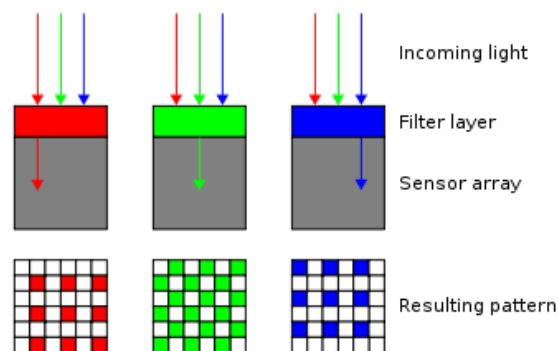


Figura A.3. Perfil del Color Filter Array

La disposición del CFA hace que cada uno de los pixels del sensor (también denominados *sensels*) sea sensible a un único color primario RGB. De esta forma la imagen original que se forma sobre el sensor queda submuestreada en cada uno de los tres canales según la disposición.

Existen diferentes tipos de distribuciones de los CFA según el fabricante y modelo. Tradicionalmente los *sensels* RGB se distribuyen formando un ajedrezado tal que por cada cuatro *sensels*, dos se corresponden al verde en las diagonales, uno a rojo y el restante al azul. Se pretende así imitar la proporción de bastones en el ojo humano, que también está en una proporción 1:2:1.

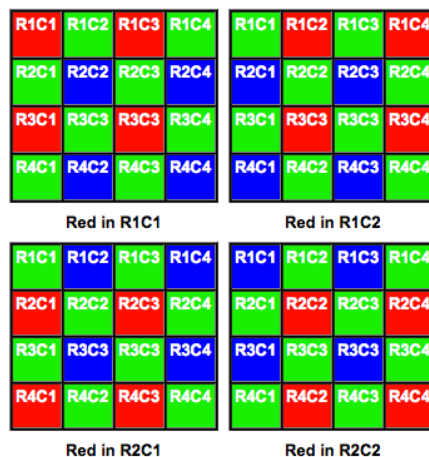


Figura A.4. Diferentes distribuciones clásicas del CFA

La MIGHTEX CCE-C013-U tiene un sensor ICX205AK de Sony sigue una distribución tRojo en R2C1 como muestra la fig.A.4, aunque otros fabricantes han desarrollado sus propias distribuciones para intentar mejorar la sensibilidad a la luz o conseguir imágenes con esquemas de color más realistas.

Anexo B. Formatos de imagen. Algoritmo de Demosaico y Conversión

A la hora de diseñar el funcionamiento *core* de la aplicación uno de los aspectos más importantes que hay que tener en cuenta es el formato de imagen de los datos de salida de la cámara y la conversión entre los mismos. La serie MIGHTEX CCX ofrece dos formatos de salida, *raw* y *bitmap*.

Formatos de Imagen

El formato *raw* es el formato de salida original del CFA del sensor de la cámara, que contiene los *sensels* RGB según la disposición de Bayer. El uso del formato *raw* resulta más fidedigno pues sólo está sometido a las modificaciones de ganancia que realiza internamente la cámara. Sin embargo su uso conlleva una reducción inherente de la resolución en altura y anchura de la imagen, debido al submuestreo de los canales RGB que supone el uso de un CFA, como puede apreciarse en la fig.B.1.

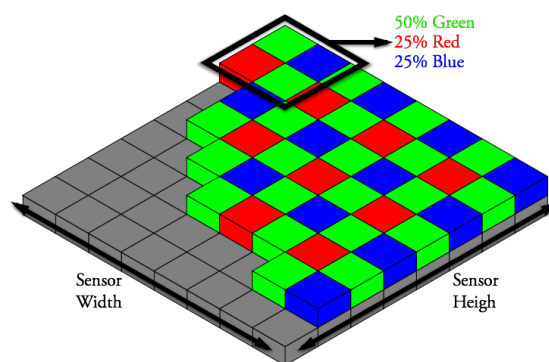


Figura B.1. Esquema de la distribución de un CFA. Se aprecia el submuestreo en RGB.

Esto supone que, para una resolución eficaz máxima de la cámara de 1.392x1.040 obtendremos unas imágenes R y B con la cuarta parte y otra G con la mitad de la resolución original. Las cámaras MIGHTEX de la serie CCX tienen una profundidad en modo *raw* máxima de 12bits, si bien los cuatro bits menos significativos (LSB) se descartan si se utilizan algoritmos de demosaico.

Para la lectura de buffer de una imagen *raw*, el SDK de la cámara proporciona las funciones necesarias a través de su *.dll*. Así, cuando una nueva imagen *raw* está lista para ser leída, se invoca al FD1 que recibe un puntero a la dirección de memoria donde se encuentra el primer píxel *raw*, en este caso, un valor verde. La lectura de las sucesivas direcciones de memoria da como resultado la lectura por filas de la imagen *raw*; esto quiere decir que para la distribución Rojo R2C1 del sensor, se lee primero una línea con el patrón verde-azul-verde, seguida de otra rojo-verde-rojo y así sucesivamente hasta recorrer toda la matriz.

Esta distribución complica el proceso de filtrado y extracción de parámetros, pues la ubicación de los diferentes píxeles de cada canal depende del número de fila y columna, ralentizando así las operaciones entre imágenes.

El formato *bitmap*, por su parte, se caracteriza porque cada uno de sus píxeles contiene tres valores correspondientes a las componentes RGB diferentes, por lo que cada canal de color tiene la misma resolución que la imagen original completa. Las cámaras de la serie CCX también disponen de la opción de salida en *bitmap* en un formato estándar de 24bpp, esto es, 8bits por cada subpixel de color, que logran aplicando un filtrado de *demosaico* sobre la imagen *raw* original, que realiza la cámara internamente.

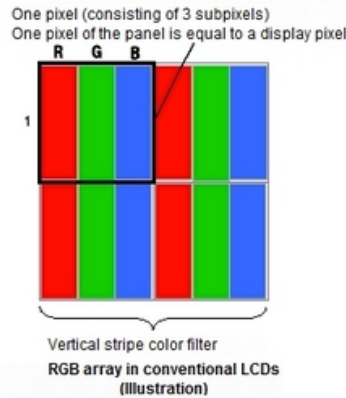


Figura B.2. Diagrama de cuatro píxeles RGB

La lectura de imágenes *bitmap* del buffer de la cámara se realiza de forma análoga al anterior; cada vez que una nueva imagen está lista, se invoca al FD1 con una dirección de memoria que se corresponde a la del primer byte de color del primer píxel, leyendo por filas sucesivamente. Huelga decir que, aunque se habla típicamente de RGB, la estructura de lectura de bytes de color sigue un esquema inverso, BGR.

De entre estos dos formatos se optó por el uso del *bitmap* debido a su eficiencia de y sencillez de implementación con las librerías ya existentes.

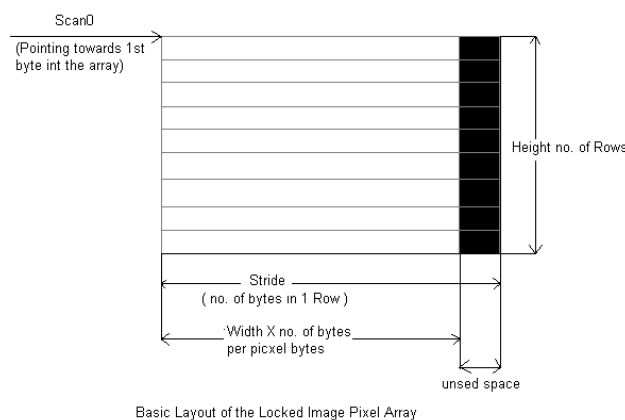


Figura B.3. Distribución de los píxeles en el formato Bitmap.

En este apartado cabe destacar también la diferencia entre el formato de imagen *bitmap* y el contenedor de imagen *Bitmap* que es con el que operan las librerías. *Bitmap* es un contenedor cuyos píxeles están bloqueados (ubicados en *Managed Memory*) que almacena los datos de color en BGR por filas. Esto significa que no se puede acceder directamente al

valor numérico de un pixel ni a uno de sus subpíxeles, sino que hay que desbloquear la imagen primero antes de operar con ellos.

A la hora de realizar la lectura se comienza desde la primera dirección de memoria en la que está almacenada la primera palabra correspondiente con el primer pixel BGR (3bytes, uno por color en cada caso). Así, al final de cada fila existe un *padding* o relleno según se aprecia en la fig.B.3. Este relleno no contiene información de imagen, y ha de ser omitido a la hora de manejar las imágenes.

Demosaico y Conversión

La conversión de la imagen desde el formato *raw* hasta el formato *bitmap* recae sobre el algoritmo de *demosaico*. Los algoritmos de *demosaico* se utilizan en la mayoría de cámaras modernas para reconstruir una imagen completamente a color a partir de la salida de su sensor con un CFA, de ahí que también se lo llame Interpolación CFA.

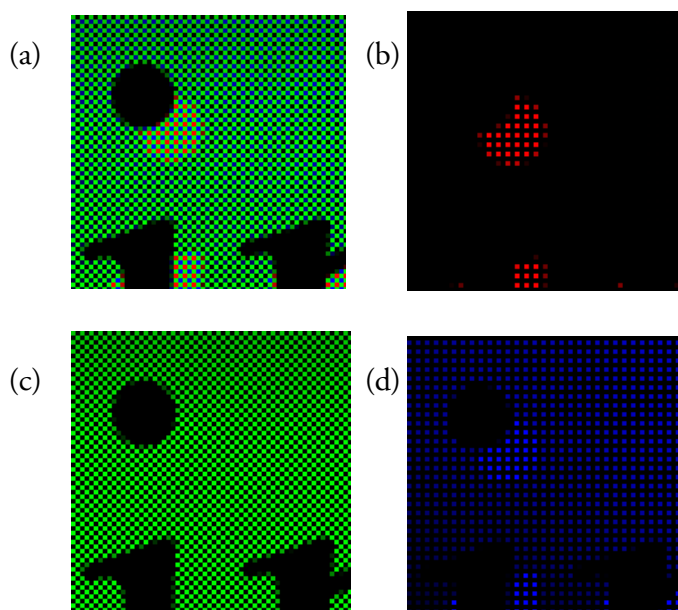


Figura B.4. Salida del CFA (a). Canal Rojo (b). Canal Verde (c). Canal Azul (d).

La meta de los algoritmos de *demosaico* es lograr una imagen lo más fiel a la realidad sin suponer una carga computacional excesiva, conservando en la medida de lo posible la mejor profundidad de bits y el mejor detalle posible.

Muchos son los algoritmos existentes para la construcción de una imagen *bitmap*. En líneas generales, pueden clasificarse en algoritmos adaptativos y no adaptativos; mientras los algoritmos no adaptativos, como su nombre indica, aplican el mismo patrón de interpolación sobre todo el campo de píxeles, los algoritmos adaptativos detectan características locales de la imagen para realizar predicciones más efectivas.

La elección del tipo de algoritmo queda subordinada al tipo de aplicación para el cual se requiere; mientras la interpolación mediante “Vecino más cercano”, no adaptativo, ofrece el mejor rendimiento pero la mayor distorsión, otros la “interpolación mediante número de gradientes variable con umbral” ofrecen una calidad de imagen inmejorable a expensas de ser computacionalmente muy pesados.

A partir de las hojas de especificaciones de la MIGHTEX CCE-C013-U no se puede averiguar cual es el algoritmo de *demosaico* utilizado, por lo que no se puede sopesar su idoneidad o mejorarse por software. Si bien, tras comprobar que el uso del formato *bitmap* no supone una penalización de fuga de los canales de color, se optó por seguir utilizándolo para simplificar la implementación general del filtrado y procesado posteriores.

Anexo C. Hojas de Especificaciones

Principales características de la cámara

Para la captación de imágenes se ha utilizado una cámara CCE-C013-U, de MIGHTEX. Las cámara CCD USB 2.0 de la familia CCX de MIGHTEX se caracterizan por ser dispositivos de alta sensibilidad y bajo ruido, optimizadas para una amplia variedad de sistemas, que van desde visión por computador, pasando por imagen médica hasta microscopía digital, como es el caso.



Figura C.1. CCE-C013-U sin carcasa (izq.) y con carcasa (dcha.).

Dentro de sus características principales cabe destacar el chip CCD 1/3" ICX205AK de Sony, que le permite una resolución máxima real de 1.392 x 1.040 píxeles a 8 bits (color) o 12 bits (blanco y negro), y 15fps con marcos progresivos, pudiendo configurar distintas resoluciones hasta subir a los 49fps con una resolución menor de 348 x 256 píxeles (salto 1:4).

A continuación se detallan las características más importantes de la cámara según sus hojas de especificaciones.

Buffered USB2.0 Color 1.4MP CCD Cameras

(Part Numbers: CCN-C013-U, CCE-C013-U)

FEATURES

- Built-in frame buffer (24 frames at full resolution)
- Support simultaneous image capturing from multiple cameras
- 4-pin GPIOs
- Higher sensitivity than CMOS cameras
- 1,392 x 1,040 active pixels
- High-speed USB2.0 (480Mb/s)
- Digital output, no need for frame grabber
- Full-featured SDK
- DirectShow and TWAIN driver
- USB command set for non-Windows based applications
- Linux driver available
- External and Software trigger
- Strobe output for external flash
- ROI & pixel skipping/binning
- No need for external power supply
- OEM versions available

APPLICATIONS

- Digital microscopy
- Machine vision
- Medical imaging
- Semiconductor equipment
- Test instruments
- Document scanners
- 2D barcode readers
- Web camera and security video
- High-quality ID photos



PRODUCT DESCRIPTION

Mightex USB 2.0 CCD cameras with frame buffers are optimized for machine-vision applications, and they can be also used for a wide variety of applications (such as industrial inspections, digital microscopy and medical imaging) which require good quality cameras that are easy to use and cost-effective. These cameras have built-in frame buffers, external trigger-in, strobe-out, and a powerful camera engine that supports multiple cameras. Frame rate can be as high as 15 fps in full resolution and up to 80 fps using ROI mode. A user-friendly GUI based application software and an SDK are provided for custom software development. In addition, a DirectShow driver and a TWAIN driver are available to easily link the cameras with users' applications. A USB command set protocol and a Linux driver are also provided for non-Windows based applications.

PERFORMANCE SPECIFICATIONS

| Parameters | CCN-C013-U | CCE-C013-U | Unit |
|----------------------------------|--|---|------|
| Board-level / enclosed | Board-level | Enclosed | |
| Number of GPIOs | 4 | 4 | |
| Resolution | 1,392 x 1,040 Color | | |
| Bit | 8/12 | | bits |
| CCD Chip | 1/3" Sony ICX205AK, Global Shutter | | |
| Pixel Size | 4.65 x 4.65 | | µm |
| Active Imager Size | 7.60 x 6.20 | | mm |
| Scanning System | Progressive | | |
| Frame Rates* (@28MHz Clock) | 15 @1,392 x 1,040 49 @348 x 256 (1:4 Skip)* Resolution dependent @ ROI | | fps |
| Sub Resolutions | 348 x 256 (1:4 Skip) | | |
| Shutter Speed (Exposure time) | 0.05 ~ 200,000 | | ms |
| Hardware Gains | 6 ~ 43 | | dB |
| Trigger Mode | With external trigger ** | | |
| Trigger Delay | < 25 | | µs |
| Strobe Out | Yes | | |
| Lens Mount | C- mount or CS-mount | | |
| Built-in Filters | IR-cut (factory standard), no filter, or IR-pass | | |
| Power Consumption | < 1.8 | | W |
| Dimension | 89 x 64 x 34 (CS-mount) 89 x 64 x 39 (C-mount) | 95 x 70 x 38.5 (CS-mount) 95 x 70 x 43.5 (C-mount) | mm |
| Weight (excluding lens) | 80 | 150 | g |

* The actual achievable frame rate depends on exposure time, as well as available resources of PC system.

** Part number of the trigger cable for external trigger : ACC-CAM-DIN8

Mightex Systems, 2343 Brimley Road, Suite 868, Toronto, Ontario M1S 3L6, Canada
Tel: 1-416-840-4991 or 1-925-218-1885, Fax: 1-416-840-6541, Email: sales@mightex.com
www.mightex.com or www.mightexsystems.com

 **Mightex**
Simply Brighter

Buffered USB2.0 Color 1.4MP CCD Cameras

(Part Numbers: CCN-C013-U, CCE-C013-U)

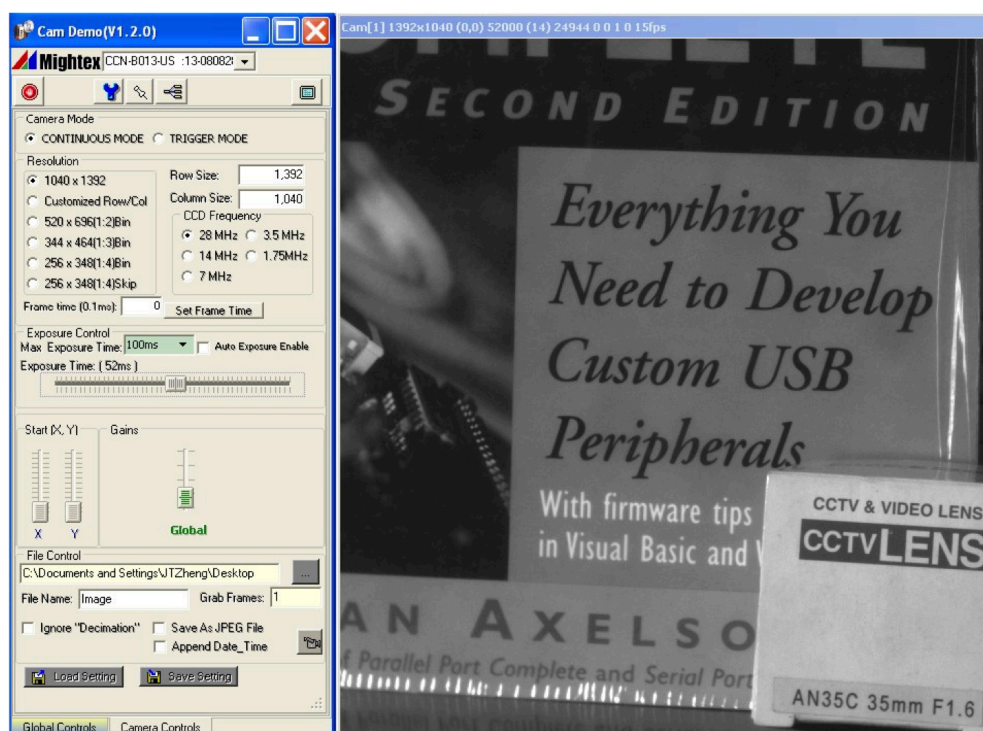
OPERATION CONDITION

| | |
|------------------------------------|--------------|
| Operating Temperature Range: | 0°C ~ 45°C |
| Storage Temperature Range: | -25°C ~ 85°C |
| Relative Humidity, Non-condensing: | 5% ~ 95% |

RECOMMENDED SYSTEM CONFIGURATION

| | |
|-------------------------|---|
| Processor: | Pentium III 900 MHz or better, or a compatible processor |
| Operating System: | Windows 2000, XP, Vista, Windows 7 and 8 |
| RAM: | 256MB or greater |
| Hard Disk Space: | 30MB for software installation, plus additional space for storing captured images |
| USB2.0 Host Controller: | Intel integrated host controller (recommended) |

EXAMPLE OF GRAPHICAL USER INTERFACE



Mightex Systems, 2343 Brimley Road, Suite 868, Toronto, Ontario M1S 3L6, Canada
 Tel: 1-416-840-4991 or 1-825-218-1885, Fax: 1-416-840-6541, Email: sales@mightex.com
 www.mightex.com or www.mightexsystems.com

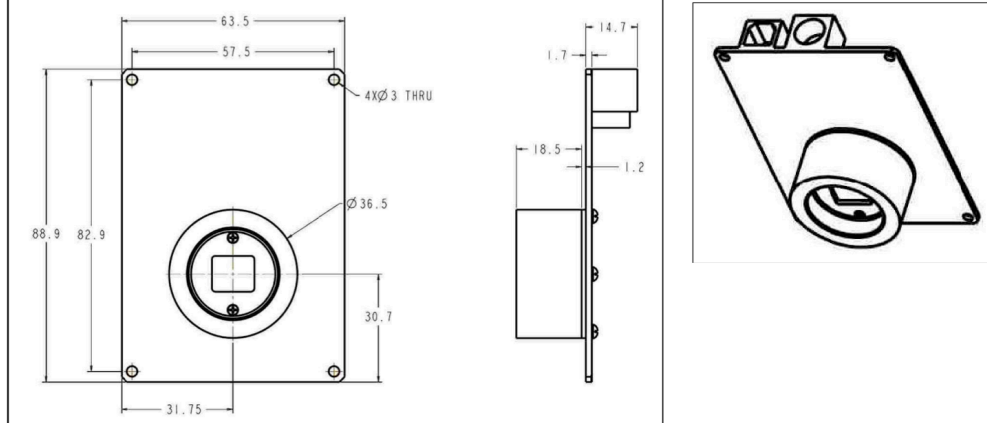
Mightex
 Simply Brighter

Buffered USB2.0 Color 1.4MP CCD Cameras

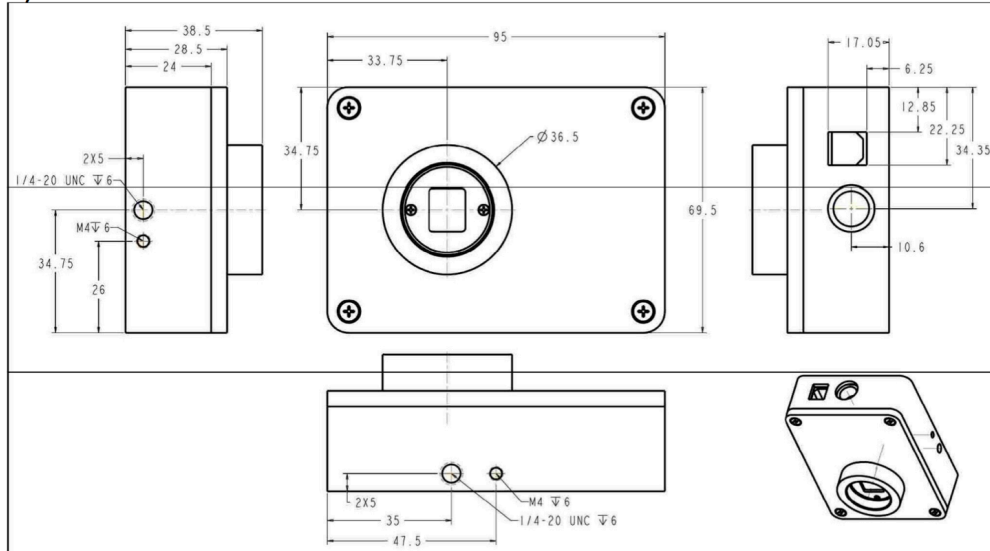
(Part Numbers: CCN-C013-U, CCE-C013-U)

INSTALLATION DRAWINGS

1) Board-level Camera with CS-mount



2) Enclosed camera with CS-mount



Especificaciones del Sensor CCD ICX2005AK

SONY
ICX2005AK
Diagonal 8mm (Type 1/2) Progressive Scan CCD Image Sensor with Square Pixel for Color Cameras

Description

The ICX2005AK is a diagonal 8mm (Type 1/2) interline CCD solid-state image sensor with a square pixel array and 1.45M effective pixels. Progressive scan allows all pixels' signals to be output independently within approximately 1/7.5 second. Also, the adoption of high frame rate readout mode supports 30 frames per second. This chip features an electronic shutter with variable charge-storage time which makes it possible to realize full-frame still image without a mechanical shutter. High resolution and high color reproductivity are achieved through the use of R, G, B primary color mosaic filters. Further, high sensitivity and low dark current are achieved through the adoption of HAD (Hole-Accumulation Diode) sensors.

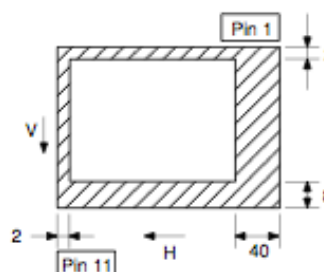
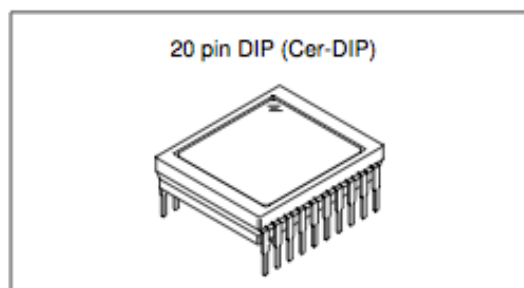
This chip is suitable for applications such as electronic still cameras, PC input cameras, etc.

Features

- Progressive scan allows individual readout of the image signals from all pixels.
- High horizontal and vertical resolution (both approx. 800TV-lines) still image without a mechanical shutter.
- Supports high frame rate readout mode (effective 256 lines output, 30 frame/s)
- Square pixel
- Horizontal drive frequency: 14.318MHz
- No voltage adjustments (reset gate and substrate bias are not adjusted.)
- R, G, B primary color mosaic filters on chip
- High resolution, high color reproductivity, high sensitivity, low dark current
- Low smear, excellent antiblooming characteristics
- Continuous variable-speed shutter

Device Structure

- Interline CCD image sensor
- Image size: Diagonal 8mm (Type 1/2)
- Total number of pixels: 1434 (H) × 1050 (V) approx. 1.50M pixels
- Number of effective pixels: 1392 (H) × 1040 (V) approx. 1.45M pixels
- Number of active pixels: 1360 (H) × 1024 (V) approx. 1.40M pixels (7.959mm diagonal)
- Chip size: 7.60mm (H) × 6.20mm (V)
- Unit cell size: 4.65μm (H) × 4.65μm (V)
- Optical black:
 - Horizontal (H) direction: Front 2 pixels, rear 40 pixels
 - Vertical (V) direction: Front 8 pixels, rear 2 pixels
- Number of dummy bits:
 - Horizontal 20
 - Vertical 3
- Substrate material: Silicon



**Optical black position
(Top View)**

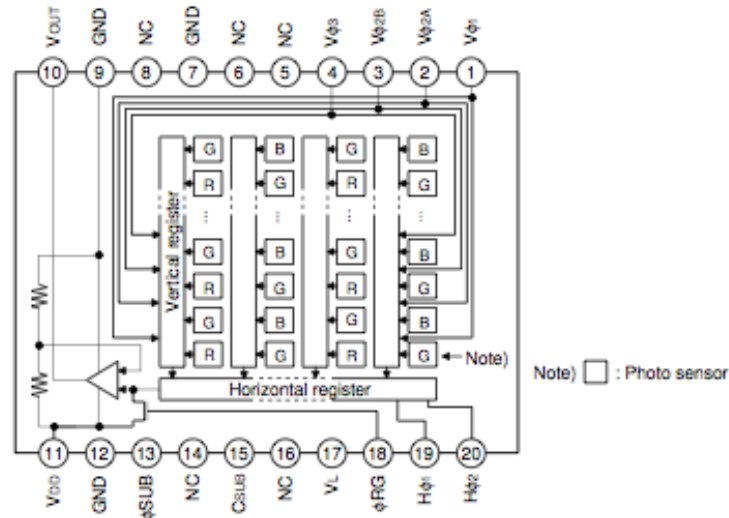
WfineCCD®

* Wfine CCD is a registered trademark of Sony Corporation.
Represents a CCD adopting progressive scan, primary color filter and square pixel.

Sony reserves the right to change products and specifications without prior notice. This information does not convey any license by any implication or otherwise under any patents or other right. Application circuits shown, if any, are typical examples illustrating the operation of the devices. Sony cannot assume responsibility for any problems arising out of the use of these circuits.

Block Diagram and Pin Configuration

(Top View)

**Pin Description**

| Pin No. | Symbol | Description | Pin No. | Symbol | Description |
|---------|--------|----------------------------------|---------|--------|------------------------------------|
| 1 | Vφ1 | Vertical register transfer clock | 11 | VDD | Supply voltage |
| 2 | Vφ2A | Vertical register transfer clock | 12 | GND | GND |
| 3 | Vφ2B | Vertical register transfer clock | 13 | φSUB | Substrate clock |
| 4 | Vφ3 | Vertical register transfer clock | 14 | NC | |
| 5 | NC | | 15 | CSUB | Substrate bias ^{*1} |
| 6 | NC | | 16 | NC | |
| 7 | GND | GND | 17 | VL | Protective transistor bias |
| 8 | NC | | 18 | φRG | Reset gate clock |
| 9 | GND | GND | 19 | Hφ1 | Horizontal register transfer clock |
| 10 | VOUT | Signal output | 20 | Hφ2 | Horizontal register transfer clock |

^{*1} DC bias is generated within the CCD, so that this pin should be grounded externally through a capacitance of 0.1μF.

SONY

ICX205AK

Absolute Maximum Ratings

| Item | | Ratings | Unit | Remarks |
|--------------------------|---|-------------|------|---------|
| Against ϕ SUB | V_{DD} , V_{OUT} , ϕ RG – ϕ SUB | –40 to +10 | V | |
| | $V\phi_{2A}$, $V\phi_{2B}$ – ϕ SUB | –50 to +15 | V | |
| | $V\phi_1$, $V\phi_3$, V_L – ϕ SUB | –50 to +0.3 | V | |
| | $H\phi_1$, $H\phi_2$, GND – ϕ SUB | –40 to +0.3 | V | |
| | C_{SUB} – ϕ SUB | –25 to | V | |
| Against GND | V_{DD} , V_{OUT} , ϕ RG, C_{SUB} – GND | –0.3 to +18 | V | |
| | $V\phi_1$, $V\phi_{2A}$, $V\phi_{2B}$, $V\phi_3$ – GND | –10 to +18 | V | |
| | $H\phi_1$, $H\phi_2$ – GND | –10 to +15 | V | |
| Against V_L | $V\phi_{2A}$, $V\phi_{2B}$ – V_L | –0.3 to +28 | V | |
| | $V\phi_1$, $V\phi_3$, $H\phi_1$, $H\phi_2$, GND – V_L | –0.3 to +15 | V | |
| Between input clock pins | Voltage difference between vertical clock input pins | to +15 | V | *1 |
| | $H\phi_1$ – $H\phi_2$ | –16 to +16 | V | |
| | $H\phi_1$, $H\phi_2$ – $V\phi_3$ | –16 to +16 | V | |
| Storage temperature | | –30 to +80 | °C | |
| Operating temperature | | –10 to +60 | °C | |

*1 +24V (Max.) when clock width < 10 μ s, clock duty factor < 0.1%.

+16V (Max.) is guaranteed for turning on or off power supply.

Bias Conditions

| Item | Symbol | Min. | Typ. | Max. | Unit | Remarks |
|----------------------------|------------------|-------|------|-------|------|---------|
| Supply voltage | V _{DD} | 14.55 | 15.0 | 15.45 | V | |
| Protective transistor bias | V _L | *1 | | | | |
| Substrate clock | φ _{SUB} | *2 | | | | |
| Reset gate clock | φ _{RG} | *2 | | | | |

*1 V_L setting is the V_{VL} voltage of the vertical transfer clock waveform, or the same power supply as the V_L power supply for the V driver should be used.

*2 Do not apply a DC bias to the substrate clock and reset gate clock pins, because a DC bias is generated within the CCD.

DC Characteristics

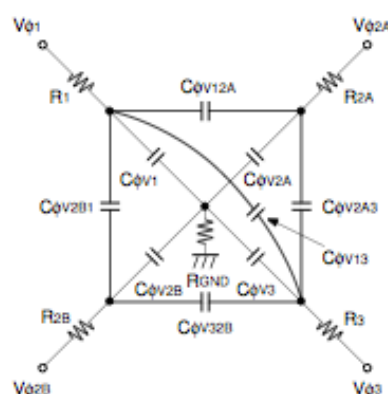
| Item | Symbol | Min. | Typ. | Max. | Unit | Remarks |
|----------------|-----------------|------|------|------|------|---------|
| Supply current | I _{DD} | | 5.5 | | mA | |

Clock Voltage Conditions

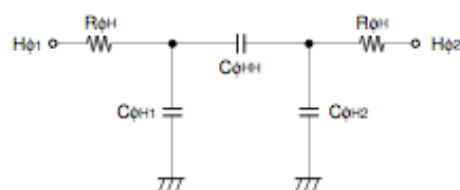
| Item | Symbol | Min. | Typ. | Max. | Unit | Waveform diagram | Remarks |
|-----------------------------------|--|-------|------|-------|------|------------------|--|
| Readout clock voltage | V _{VT} | 14.55 | 15.0 | 15.45 | V | 1 | |
| Vertical transfer clock voltage | V _{VH02A} | -0.05 | 0 | 0.05 | V | 2 | V _{VH} = V _{VH02A} |
| | V _{VH1} , V _{VH2A} , V _{VH2B} , V _{VH3} | -0.2 | 0 | 0.05 | V | 2 | |
| | V _{VL1} , V _{VL2A} , V _{VL2B} , V _{VL3} | -8.4 | -8.0 | -7.6 | V | 2 | V _{VL} = (V _{VL1} + V _{VL3})/2 |
| | V _{φ1} , V _{φ2A} , V _{φ2B} , V _{φ3} | 7.6 | 8.0 | 8.4 | V | 2 | |
| | V _{VL1} - V _{VL3} | | | 0.1 | V | 2 | |
| | V _{VHH} | | | 0.9 | V | 2 | High-level coupling |
| | V _{VHL} | | | 1.3 | V | 2 | High-level coupling |
| | V _{VLH} | | | 1.0 | V | 2 | Low-level coupling |
| | V _{VLL} | | | 0.9 | V | 2 | Low-level coupling |
| Horizontal transfer clock voltage | V _{φH} | 4.75 | 5.0 | 5.25 | V | 3 | |
| | V _{φL} | -0.05 | 0 | 0.05 | V | 3 | |
| Reset gate clock voltage | V _{φRG} | 3.0 | 3.3 | 5.5 | V | 4 | |
| | V _{RGLH} - V _{RGLL} | | | 0.4 | V | 4 | Low-level coupling |
| | V _{RGL} - V _{RGLm} | | | 0.5 | V | 4 | Low-level coupling |
| Substrate clock voltage | V _{φSUB} | 22.15 | 23.0 | 23.85 | V | 5 | |

Clock Equivalent Circuit Constant

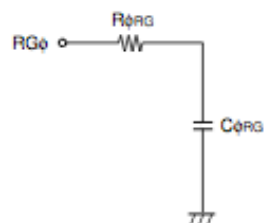
| Item | Symbol | Min. | Typ. | Max. | Unit | Remarks |
|---|--------------------------|------|------|------|----------|---------|
| Capacitance between vertical transfer clock and GND | $C\phi V1$ | | 2200 | | pF | |
| | $C\phi V2A$ | | 1800 | | pF | |
| | $C\phi V2B$ | | 6800 | | pF | |
| | $C\phi V3$ | | 3300 | | pF | |
| Capacitance between vertical transfer clocks | $C\phi V12A, C\phi V2B1$ | | 1200 | | pF | |
| | $C\phi V2A3, C\phi V32B$ | | 1200 | | pF | |
| | $C\phi V13$ | | 2200 | | pF | |
| Capacitance between horizontal transfer clock and GND | $C\phi H1, C\phi H2$ | | 47 | | pF | |
| Capacitance between horizontal transfer clocks | $C\phi HH$ | | 100 | | pF | |
| Capacitance between reset gate clock and GND | $C\phi RG$ | | 8 | | pF | |
| Capacitance between substrate clock and GND | $C\phi SUB$ | | 680 | | pF | |
| Vertical transfer clock series resistor | $R1$ | | 36 | | Ω | |
| | $R2A, R3$ | | 56 | | Ω | |
| | $R2B$ | | 43 | | Ω | |
| Vertical transfer clock ground resistor | R_{GND} | | 30 | | Ω | |
| Horizontal transfer clock series resistor | $R\phi H$ | | 15 | | Ω | |
| Reset gate clock series resistor | $R\phi RG$ | | 20 | | Ω | |



Vertical transfer clock equivalent circuit



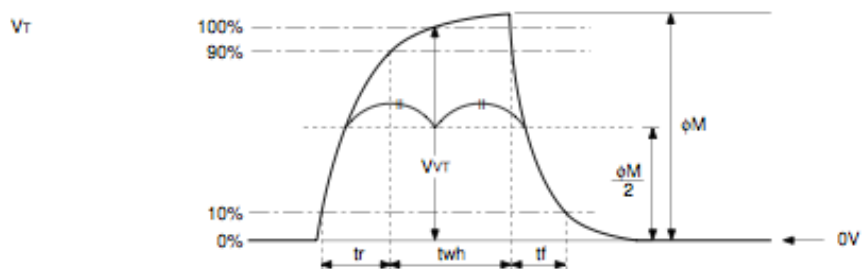
Horizontal transfer clock equivalent circuit



Reset gate clock equivalent circuit

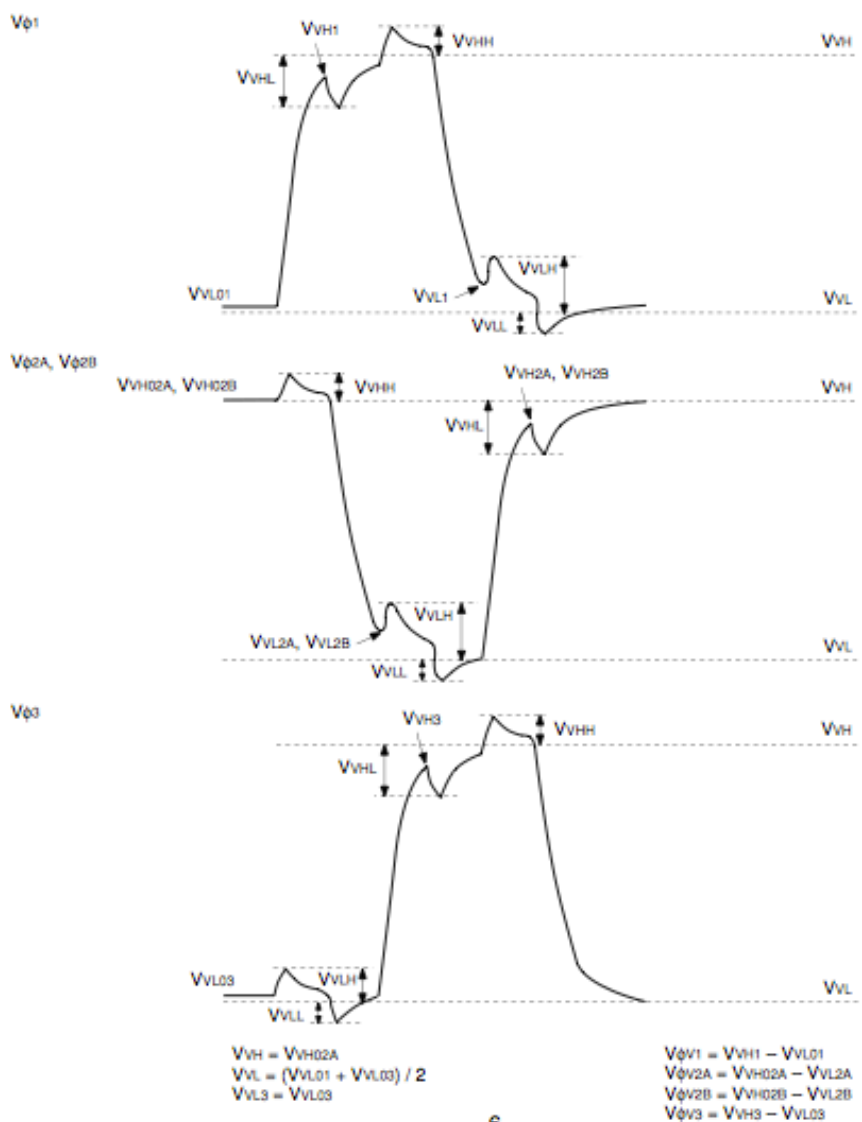
Drive Clock Waveform Conditions

(1) Readout clock waveform



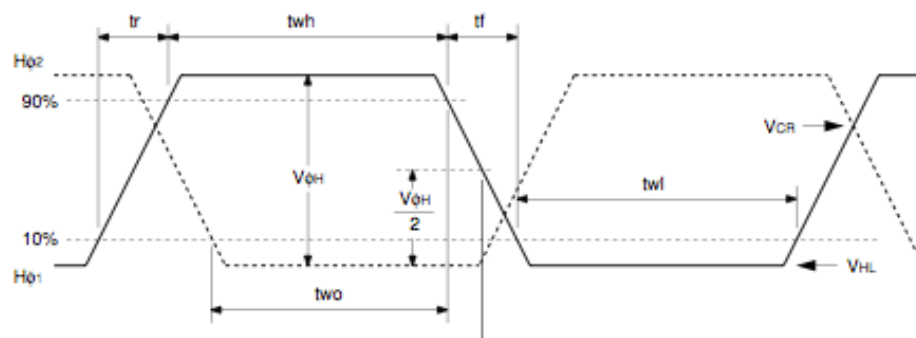
Note) Readout clock is used by composing vertical transfer clocks $V\phi 2A$ and $V\phi 2B$.

(2) Vertical transfer clock waveform

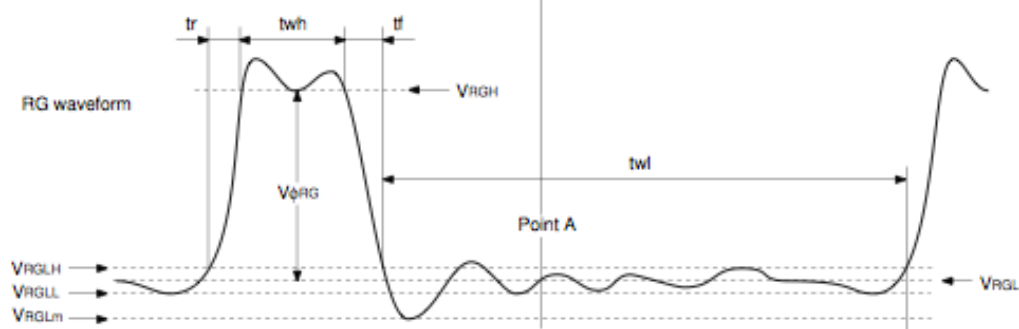


SONY

ICX205AK

(3) Horizontal transfer clock waveform

Cross-point voltage for the H_{01} rising side of the horizontal transfer clocks H_{01} and H_{02} waveforms is V_{CR} .
The overlap period for t_{wh} and t_{wl} of horizontal transfer clocks H_{01} and H_{02} is two .

(4) Reset gate clock waveform

$VRGLH$ is the maximum value and $VRGLL$ is the minimum value of the coupling waveform during the period from Point A in the above diagram until the rising edge of RG.

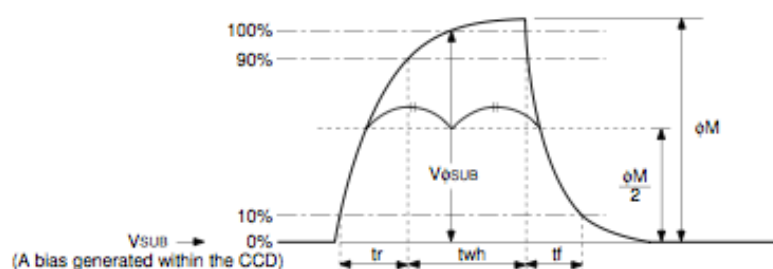
In addition, $VRGL$ is the average value of $VRGLH$ and $VRGLL$.

$$VRGL = (VRGLH + VRGLL)/2$$

Assuming $VRGH$ is the minimum value during the interval t_{wh} , then:

$$V_{\phi RG} = VRGH - VRGL$$

Negative overshoot level during the falling edge of RG is $VRGLm$.

(5) Substrate clock waveform

Clock Switching Characteristics

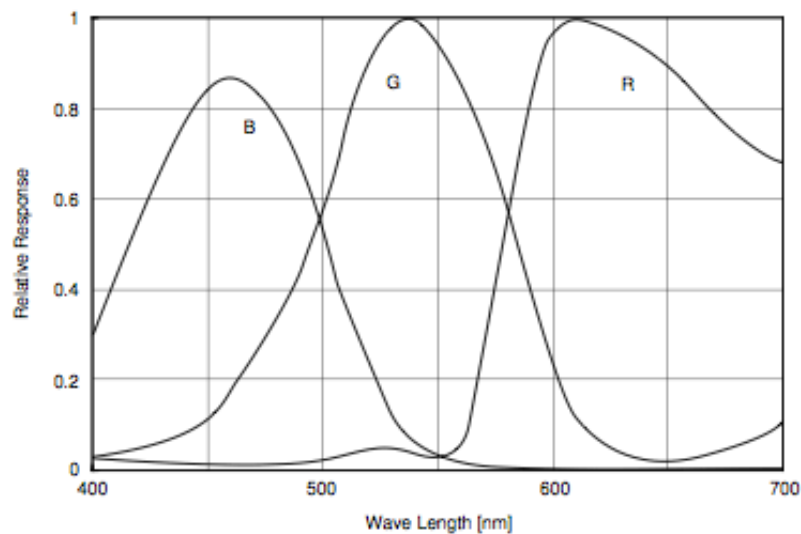
| Item | Symbol | twh | | | twl | | | tr | | | tf | | | Unit | Remarks |
|---------------------------|--|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------------|
| | | Min. | Typ. | Max. | Min. | Typ. | Max. | Min. | Typ. | Max. | Min. | Typ. | Max. | | |
| Readout clock | V _T | 2.3 | 2.5 | | | | | | 0.5 | | | 0.5 | | μs | During readout |
| Vertical transfer clock | V _{φ1} , V _{φ2A} , V _{φ2B} , V _{φ3} | | | | | | | | | | 15 | | 450 | ns | *1 |
| Horizontal transfer clock | During imaging | H _{φ1} | 20 | 25 | | 20 | 25 | | 10 | 15 | | 10 | 15 | ns | *2 |
| | | H _{φ2} | 20 | 25 | | 20 | 25 | | 10 | 15 | | 10 | 15 | | |
| | During parallel-serial conversion | H _{φ1} | | | | | | | 0.01 | | | 0.01 | | μs | |
| | | H _{φ2} | | | | | | | 0.01 | | | 0.01 | | | |
| Reset gate clock | φ _{RG} | 11 | 13 | | | 51 | | | 3 | | | 3 | | ns | |
| Substrate clock | φ _{SUB} | | 2.2 | | | | | | | 0.5 | | | 0.5 | μs | During drain charge |

*1 When vertical transfer clock driver CXD1267AN × 2 is used.

*2 $t_f \geq t_r - 2\text{ns}$, and the cross-point voltage (V_{CR}) for the H_{φ1} rising side of the H_{φ1} and H_{φ2} waveforms must be at least $V_{\phi H}/2$ [V].

| Item | Symbol | two | | | Unit | Remarks |
|---------------------------|-----------------------------------|------|------|------|------|---------|
| | | Min. | Typ. | Max. | | |
| Horizontal transfer clock | H _{φ1} , H _{φ2} | 16 | 20 | | ns | |

Spectral Sensitivity Characteristics (excludes lens characteristics and light source characteristics)



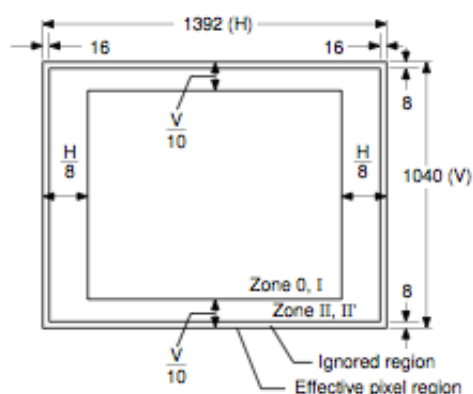
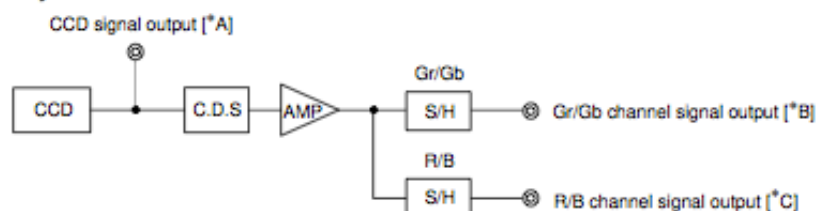
SONY

ICX205AK

Image Sensor Characteristics

(Ta = 25°C)

| Item | Symbol | Min. | Typ. | Max. | Unit | Measurement method | Remarks |
|--|--------------|------|-------|--------|------|--------------------|-----------------------|
| G sensitivity | Sg | 320 | 400 | | mV | 1 | 1/30s accumulation |
| Sensitivity comparison | R | Rr | 0.4 | 0.55 | 0.7 | 1 | |
| | B | Rb | 0.3 | 0.45 | 0.6 | 1 | |
| Saturation signal | Vsat | 450 | | | mV | 2 | Ta = 60°C |
| Smear | Sm | | 0.001 | 0.0025 | % | 3 | No electronic shutter |
| Video signal shading | SHg | | | 20 | % | 4 | Zone 0 and I |
| | | | | 25 | % | 4 | Zone 0 to II' |
| Uniformity between video signal channels | ΔSrg | | | 8 | % | 5 | |
| | ΔSbg | | | 8 | % | 5 | |
| Dark signal | Vdt | | | 16 | mV | 6 | Ta = 60°C |
| Dark signal shading | ΔVdt | | | 4 | mV | 7 | Ta = 60°C |
| Line crawl G | Lcg | | | 3.8 | % | 8 | |
| Line crawl R | Lcr | | | 3.8 | % | 8 | |
| Line crawl B | Lcb | | | 3.8 | % | 8 | |
| Lag | Lag | | | 0.5 | % | 9 | |

Zone Definition of Video Signal Shading**Measurement System**

Note) Adjust the amplifier gain so that the gain between [*A] and [*B], and between [*A] and [*C] equals 1.

LED Azul en 405nm, 405-02V



LED405-series



TECHNICAL DATA

Violet LED

InGaN

LED405-series are InGaN LEDs mounted on a lead frame and encapsulated in various types of clear silicone lens, which offers different design settings.

On forward bias, it emits a radiation of typical 15 mW at a peak wavelength at 405 nm.

Specifications

- Structure: InGaN
- Peak Wavelength: typ. 405 nm
- Optical Output Power: typ. 15 mW
- Resin Material: Clear silicone resin
- Solder: Lead free

**Absolute Maximum Ratings ($T_a=25^\circ\text{C}$)**

| Type | Symbol | Value | Unit |
|------------------------------------|-----------|----------|------------------|
| Power Dissipation | P_D | 200 | mW |
| Forward Current | I_F | 50 | mA |
| Reverse Voltage | V_R | 5 | V |
| Operating Temperature | T_{OP} | -30 +85 | $^\circ\text{C}$ |
| Storage Temperature | T_{STG} | -40 +100 | $^\circ\text{C}$ |
| Soldering Temperature (for 5 sec.) | T_{SOL} | 265 | $^\circ\text{C}$ |

Electro-Optical Characteristics ($T_a=25^\circ\text{C}$)

| Item | Symbol | Condition | Min. | Typ. | Max. | Unit |
|-----------------|-----------------|-----------------------|------|------|------|---------------|
| Forward Voltage | V_F | $I_F = 20 \text{ mA}$ | - | 3.5 | 4.0 | V |
| Reverse Current | I_R | $V_R = 5 \text{ V}$ | - | - | 10 | μA |
| Radiated Power | P_O | $I_F = 20 \text{ mA}$ | - | 15 | - | mW |
| Peak Wavelength | λ_P | $I_F = 20 \text{ mA}$ | 400 | 405 | 410 | nm |
| Half Width | $\Delta\lambda$ | $I_F = 20 \text{ mA}$ | - | 15 | - | nm |



Characteristics of Radiant Intensity ($T_a=25^\circ\text{C}$)

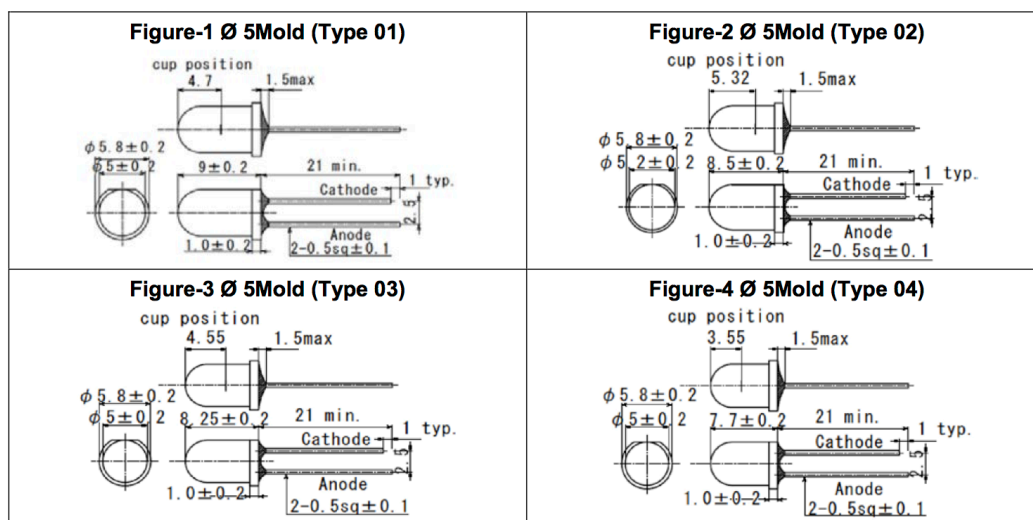
| Type | Viewing Half Angle | Brightness / Radiation Intensity (I _F = 20 mA) | | | Outer Dimension | Dimension Figure |
|-----------|--------------------|---|------|------|-----------------|------------------|
| | | [Unit: mW/sr] | | | | |
| | | Min. | Typ. | Max. | | |
| LED405-01 | ±8° | | 30 | | Ø 5 | 1 |
| LED405-02 | ±5° | | 40 | | Ø 5 | 2 |
| LED405-03 | ±10° | | 30 | | Ø 5 | 3 |
| LED405-04 | ±20° | | 13 | | Ø 5 | 4 |
| LED405-05 | ±50° | | 4 | | Ø 5 | 5 |
| LED405-06 | ±4° | | 40 | | Ø 5 | 6 |
| LED405-09 | ±25° (long) | | | | Ø 5 | 7 |
| | ±10° (short) | | | | Oval | |
| LED405-46 | | | | | Ø 5 | 8 |
| LED405-41 | ±14° | | | | Ø 4 | 9 |
| LED405-42 | ±20° | | | | Ø 4 | 10 |
| LED405-31 | | | | | Ø 3 | 11 |
| LED405-33 | ±13° | | 20 | | Ø 3 | 12 |
| LED405-34 | | | | | Ø 3 | 13 |
| LED405-36 | ±25° | | 14 | | Ø 3 | 14 |

* Radiant Power is measured by S3584-08

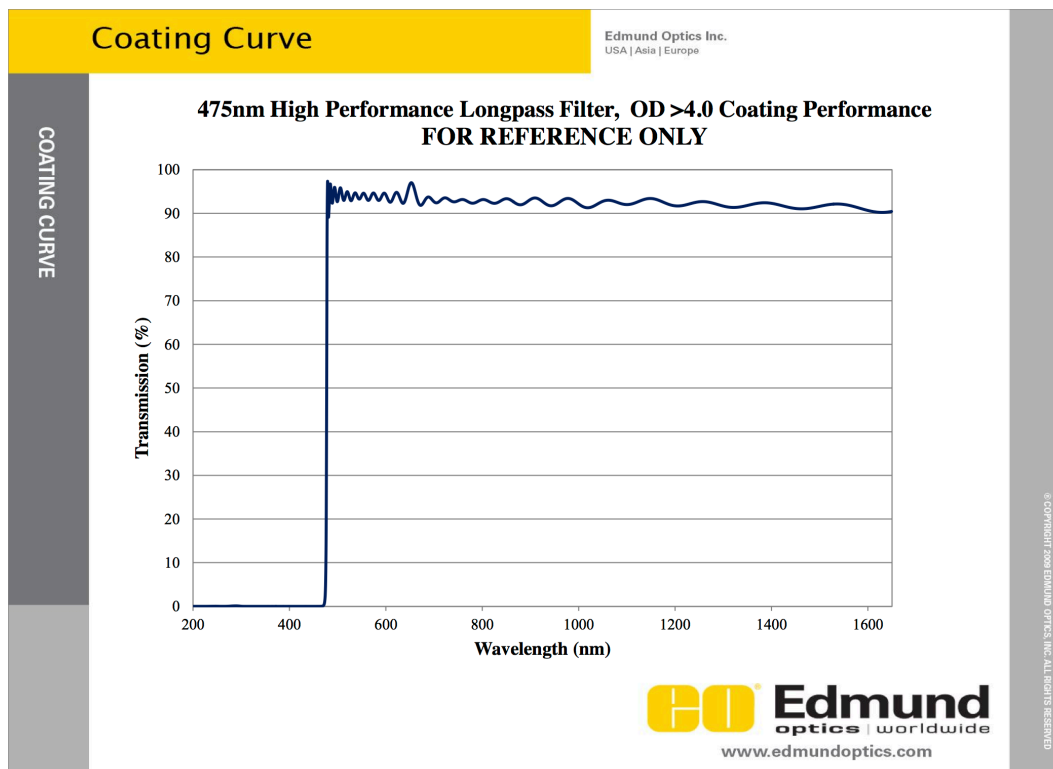
* Radiant Intensity is measured by Ando Optical Multi Meter AQ2140 & AQ2741

The above specifications are for reference purpose only and subjected to change without prior notice.

Outer Dimensions

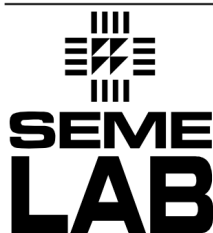


Filtro Óptico 475nm, 25mm



| | |
|----------------------------------|-----------|
| Diámetro (mm): | 25 |
| Tolerancia Diámetro (mm): | +0,0/-0,2 |
| Apertura (%): | >80 |
| Grosor (mm): | 3 |
| Tolerancia Grosor (mm): | +/-0,1 |
| Longitud de Onda Rechazada (nm): | 200-465 |
| Longitud de Onda de Paso (nm): | 483-1650 |
| Transmisión Media (%): | 91 |
| Longitud de Onda de Corte (nm): | 475 |
| Tolerancia de corte(%): | +/-1 |

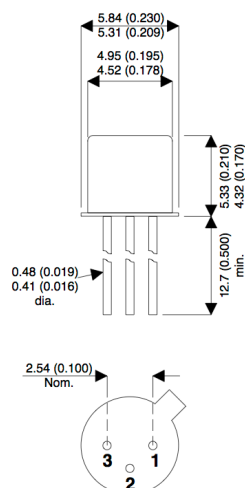
Transistor de propósito general, BC107



BC107
BC108
BC109

MECHANICAL DATA

Dimensions in mm (inches)



TO-18 METAL PACKAGE

Underside View

PIN 1 – Emitter PIN 2 – Base PIN 3 – Collector

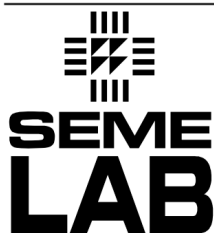
GENERAL PURPOSE SMALL SIGNAL NPN BIPOLAR TRANSISTOR

FEATURES

- SILICON NPN
- HERMETICALLY SEALED TO18
- SCREENING OPTIONS AVAILABLE

ABSOLUTE MAXIMUM RATINGS ($T_A = 25^\circ\text{C}$ unless otherwise stated)

| | | | |
|-----------|--|---------------------|---------------|
| V_{CBO} | Collector – Base Continuous Voltage | BC017 | 50V |
| | | BC108, BC109 | 30V |
| V_{CEO} | Collector – Emitter Continuous Voltage With Zero Base Current | BC107 | 45V |
| | | BC108, BC109 | 20V |
| V_{CES} | Collector – Emitter Continuous Voltage With Base Shortcircuited to Emitter | BC107 | 50V |
| | | BC108, BC109 | 30V |
| V_{EBO} | Emitter – Base Continuous Voltage Reverse Voltage | BC107 | 6V |
| | | BC108, BC109 | 5V |
| I_C | Continuous Collector Current | | 100mA |
| I_{CM} | Peak Collector Current | | 200mA |
| P_{tot} | Power Dissipation @ $T_{amb} = 25^\circ\text{C}$ | | 300mW |
| T_{amb} | Ambient Operating Temperature Range | | -65 to +175°C |
| T_{stg} | Storage Temperature Range | | -65 to +175°C |



BC107
BC108
BC109

ELECTRICAL CHARACTERISTICS ($T_A = 25^\circ\text{C}$ unless otherwise stated)

| Parameter | Test Conditions | Min. | Typ. | Max. | Unit |
|---|--|--|------|--|--------------------|
| $I_{CBO(1)}$ Collector-Base Leakage Current | $V_{CB} = 45V$ BC107 $V_{CB} = 25V$ BC108, BC109 | | | 15 15 | nA |
| $I_{CBO(1)}$ Collector-Emitter Leakage Current @ $T_{amb} = 125^\circ\text{C}$ | $V_{CB} = 45V$ BC107 $V_{CB} = 25V$ BC108, BC109 | | | 4 4 | μA |
| I_{EBO} Emitter Cut-off Current | $V_{EB} = 4V$ $I_C = 0$ | | | 1 | μA |
| h_{21E} Static Forward Current Transfer Ratio | $V_{CE} = 5V$ $I_C = 2mA$ Group A BC107, BC108 Group B All Types Group C BC108, BC109 BC107 BC108 BC109 | 110 180 380 110 110 180 | | 220 460 800 460 800 800 | |
| V_{BE} Base – Emitter Breakdown | $V_{CE} = 5V$ $I_C = 2mA$ | | | 0.7 | V |
| $V_{BE(sat)(1)}$ Base – Emitter Saturation Voltage | $I_B = 0.5mA$ $I_C = 10mA$ | | | 0.83 | V |
| $V_{CE(sat)(1)}$ Collector – Emitter Saturation Voltage | $I_B = 0.5mA$ $I_C = 10mA$ | | | 0.25 | V |
| f_T Transition Frequency | $V_{CE} = 5V$ $I_C = 10mA$ $f = 100MHz$ | 150 | | | MHz |
| F Noise Factor | $V_{CE} = 5V$ $I_C = 0.2mA$ $R = 2k\Omega$ $f = 1kHz$ $\Delta F = 200Hz$ BC109 BC107, BC108 | | | 4 10 | dB |
| h_{21e} Small Signal Forward Current Transfer Ratio | $V_{CE} = 5V$ $I_C = 2mA$ $f = 100kHz$ Group A BC107, BC108 Group B All Types Group C BC108, BC109 BC107 BC108 BC109 | 125 240 450 125 125 240 | | 260 500 900 500 900 900 | |
| h_{11e} Common Emitter Input Impedance | $V_{CE} = 5V$ $I_C = 2mA$ $f = 1kHz$ Group A BC107, BC108 Group B All Types Group C BC108, BC109 | 1.6 3.2 6.0 | | 4.5 8.5 15 | $k\Omega$ |
| h_{22e} Common Emitter Output Admittance | $V_{CE} = 5V$ $I_C = 2mA$ $f = 1kHz$ Group A BC107, BC108 Group B All Types Group C BC108, BC109 | | | 30 60 110 | μS |
| C_{22b} Common Base Output Capacitance | $V_{CB} = 10V$ $f = 1MHz$ | | | 6 | pF |
| $R_{th(j-amb)}$ Thermal Resistance: Junction to Ambient | | | | 500 | $^\circ\text{C/W}$ |

Semelab plc. Telephone +44(0)1455 556565. Fax +44(0)1455 552612. e-mail sales@semelab.co.uk
Website <http://www.semelab.co.uk>

3/99

Anexo D. Software. Librerías

AForge.NET

Para el filtrado y procesado de imagen se ha utilizado mayormente las librerías de AForge.NET; éste es un *framework* en C# diseñado para desarrolladores e investigadores que recoge multitud de recursos aplicables en diversos campos como redes neuronales, visión por computador y procesado de imagen, entre otras.

A fecha de este proyecto se encuentra en versión 2.2.5, con licencia LGPL v3, a excepción del paquete de reproducción y grabación de flujo de video, FFMPEG, que posee licencia GPL v3. Toda la documentación relativa al uso de las funcionalidades de los paquetes de la librería, así como la descarga de la propia librería y ejemplos puede realizarse desde su sitio web (AForge.NET Framework 2008)

Imagen. Métodos originales utilizados

Dentro de la librería AForge.NET, el paquete dedicado al filtrado de imagen es el AForge.Imaging.Filters. A continuación se detallan las funciones más relevantes incluidas en por defecto en el paquete utilizadas en el proyecto.

-ResizeNearestNeighbor

```
// Nuevo filtro
ResizeNearestNeighbor filtro = new ResizeNearestNeighbor((int)400, (int)300);
// Aplica el filtro
Bitmap nuevaImagen = filtro.Apply(viejaImagen);
```

Devuelve una nueva imagen resultado de redimensionar otra anterior según las dimensiones introducidas como parámetros, con el mismo formato de tamaño de píxeles que la imagen original.

Utiliza un algoritmo de “vecino más cercano”. Solo se utiliza para reducir la imagen para las miniaturas de la GUI, pues se trata de un filtro muy ligero. El filtro acepta imágenes de 24, 32, 48 y 64 bpp.

-Grayscale

```
// Nuevo filtro
Grayscale filtro = new Grayscale((double)0.3333, (double)0.3333, (double)0.3333);
// Aplica el filtro
Bitmap nuevaImagen = filtro.Apply(viejaImagen);
```

Devuelve una imagen en escala de grises según la ponderación de canales RGB introducida como parámetro. La imagen resultado puede ser de 8bpp (si la origen era de 24 o 32bpp) o de 16bpp (si la origen era de 48 o 64bpp).

Este filtro se utiliza a la salida del *CocientFilter* para normalizar el formato de pixel de cara al mapeo de color posterior, por lo que la ponderación de canales RGB toma valores iguales para los tres canales.

-Color Remapping

```
// Nuevo filtro
ColorRemapping filtro = new ColorRemapping(byte[256]R, byte[256]G, byte[256]B);
// Aplica el filtro
Bitmap nuevaImagen = filtro.Apply(viejaImagen);
```

Devuelve una imagen RGB mapeada a partir una original, según las curvas de color introducidas como parámetros. Para cada pixel de la imagen origen, el filtro devuelve sus valores correspondientes a los especificados en los índices de las curvas de color.

El filtro acepta imágenes RGB de 24 y 32bpp e imágenes en escala de grises 8bpp. Para la creación de imágenes en *pseudocolor* a partir de otras en escala de grises, como es el caso, conviene que las curvas de color tengan una correspondencia unívoca entre un pixel gris y su transformación RGB.

Imagen. Metodos diseñados para la aplicación

Para poder llevar a cabo las operaciones de procesado de imagen relativas al cálculo de los cocientes entre canales, se diseñaron otra serie de métodos específicos que normalmente no se utilizan en el filtrado de imágenes clásico, a partir de los ya incluidos en las librerías de AForge.NET.

-LogDifference

```
// Nuevo filtro
Logdifference filtro = new LogDifference((Bitmap)img2);
// Aplica el filtro
Bitmap nuevaImagen = filtro.Apply((Bitmap)img1);
```

Este filtro se diseñó a partir del filtro *Difference* incluido en el paquete de Image.Filters.

Realiza el logaritmo del cociente entre dos imágenes en escala de grises, devolviendo una nueva imagen en escalada internamente con valores 0-255, tal que el valor 0 se corresponde con un cociente $\text{img1}/\text{img2} = -\infty$ y el valor 255 a un conciente $\text{img1}/\text{img2} = \infty$.

Dada la naturaleza de los cocientes en experimentos reales, cuyos cocientes G/R se encuentran entre unos valores 0-2, la compresión de la escala en ese entorno no resultaba beneficiosa para la visualización en *pseudocolor*, por lo que se decidió no utilizar este método en el sistema final.

-Cocient

```
// Nuevo filtro
Cocient filtro = new Cocient((Bitmap)img2);
// Aplica el filtro
Bitmap nuevaImagen = filtro.Apply((Bitmap)img1);
```

Este filtro se diseñó a partir del filtro *Difference* incluido en el paquete de Image.Filters.

Realiza el cociente entre dos imágenes en escala de grises, devolviendo una nueva imagen en escalada de grises con valores 0-255. Esta nueva escala se corresponde con los valores de cocientes $\text{img1}/\text{img2}=0-2,55$, que es la máxima precisión que soporta una imagen de 8bits, suficiente para el sistema.

También tiene en cuenta los casos conflictivos propios de un cociente tales como 0/0 o x/0, tratándolos debidamente. El uso de esta cota en 2,55 para la relación entre G/R viene dada por el comportamiento de la lámina fluorescente obtenido en experimentos anteriores en los que no sobrepasaba valores de ratio de 1,8.

Cabe destacar un aspecto de la implementación de todas las funciones arriba citadas directamente involucrado con el rendimiento de los algoritmos. Las imágenes de tipo Bitmap (en contenedor) en C# forman parte de los tipos de datos en *Managed Memory*, lo que significa que están bloqueados y no se puede acceder directamente a sus valores de pixel mediante una dirección de memoria aleatoria.

De la misma manera, el desbloqueo de las mismas implica arrastrar una serie de recursos y copias en memoria que ralentiza de sobremanera cualquier operación entre imágenes. Para mejorarlo, los métodos arriba descritos utiliza el tipo *UnmanagedImage* alojados en la *Unmanaged Memory* (Memoria sin administrar) del sistema, similar al Bitmap, pero mucho más eficiente. Este formato es propio de la librería AForge.NET y está optimizado para el procesamiento de imagen intensivo.

FFmpeg

FFmpeg es una librería adoptada por AForge.NET que substituye la interfaz de Windows y que permite mayor robustez y flexibilidad. Esta librería ha de ser compilada en 3.5, pero a pesar de requerir versiones de .NET Framework inferiores a 4.0 gracias a la retrocompatibilidad de las librerías de Windows esto no supone mayor problema.

-*VideoFileWriter*

```
// Crea un nuevo flujo de video
VideoFileWriter writer = new VideoFileWriter();
writer.Open("test.avi", width, height, 25, VideoCodec.MPEG4);
// Nuevo frame para el flujo de video
writer.WriteVideoFrame((Bitmap)image);
// Cierra el flujo de video
writer.Close();
```

Crea un nuevo flujo de video sobre el archivo especificado *.avi*, fijando su altura, anchura, *fps* y códec a utilizar. Sobre ese flujo abierto, se van añadiendo los frames consecutivamente. Finalmente, se cierra el flujo, habiendo creado así un nuevo archivo.

-*VideoFileReader*

```
// Abre un flujo de video sobre un archivo existente
VideoFileReader reader = new VideoFileReader();
reader.Open("test.avi");
// Obtiene un frame en formato Bitmap y cierra el flujo de video
Bitmap videoFrame = reader.ReadVideoFrame();
reader.Close();
```

Abre un archivo de video y extrae los frames, guardándolos como datos *Bitmap* para procesarlos individualmente. Posteriormente, cierra el flujo de video. Los parámetros del flujo (altura, anchura, fps, códec de compresión, etc) se encuentran como atributos de *reader*.

Anexo E. Instalación de la Aplicación.

Con el fin de documentar el proyecto de la forma más completa posible, se ha creído conveniente describir el proceso de instalación de la aplicación desde cero de la misma manera que se realizaría en otro equipo de laboratorio cualquiera.

1. Instalar o actualizar Microsoft .NET Framework a la versión 4.5; esto garantiza la compatibilidad con el sistema de gráficas en tiempo real de la aplicación.
2. Mover las librerías de FFMPEG a los directorios de ejecución. Las librerías de captación de flujo de video han de encontrarse en el directorio de la propia aplicación. Normalmente estas librerías suelen copiarse automáticamente, pero puede ser necesario copiarlas a mano: éstas pueden encontrarse en la carpeta *Externals/ffmpeg/bin*, que son las siguientes: *avcodec-53.dll*, *avdevice-53.dll*, *avfilter-2.dll*, *avformat-53.dll*, *avutil51.dll*, *postproc.dll*, *swresample0.dll* y *rwscale.dll*.
3. Finalmente, basta con abrir el archivo ejecutable *USBCamera.exe*, que lanzará la ventana principal de la aplicación.

Índice de Figuras

- 3.1 Fotografía del sensor con la carcasa de metacrilato. Diagrama del sensor.
- 3.2 Estructuras químicas de los indicadores verde y rojo. Diagrama del corte del sensor.
- 3.3 Colores aparentes de la lámina para varias concentraciones de oxígeno. Frecuencia relativa de los píxeles de color para las diferentes concentraciones.
- 3.4 Espectro de emisión de la lámina frente a las curvas de sensibilidad del sensor.
- 3.5 Gráfica de la dependencia lineal de la concentración de oxígeno para R/G y G/R.
- 3.6 Gráfica comparativa de los canales RGB y el ratio G/R según tiempos de exposición.
- 3.7 Espectro de emisión medido de los LED Rojo y Verde y la fuente.
- 3.8 Imágenes de la cámara bajo los LEDs rojo y verde y la fuente. Canales de color.
- 3.9 Fotografía del montaje completo y sus partes. Detalle del montaje con la iluminación.
- 3.10 Diagrama de la disposición del objetivo y el ocular. Proyecciones de los objetos.
- 3.11 CCE-C013-U de MIGHTEX. Detalle del Hub USB y control de Iluminación.
- 3.12 Diagrama del Conector Din de 8 pines.
- 3.13 Diagrama del circuito del control de Iluminación.
- 4.1 Diagrama global de la Aplicación de escritorio.
- 4.2 Diagrama de bloques de la captación de imagen y tratamiento hasta el buffer.
- 4.3 Diagrama de bloques de la lectura de datos del buffer y filtrado de imagen.
- 4.4 Diagrama de bloques del procesado y extracción de los parámetros de oxígeno.
- 4.5 Curvas de recolor para la imagen en *pseudocolor*. Escala de color resultante (0-255).
- 4.6 Ejemplo del recolor de la imagen: Línea verde sobre un fondo rojo e imagen remapeada.
- 4.7 Diagrama de bloques de la GUI.
- 4.8 Ventana Principal de la Aplicación.
- 4.9 Ventanas secundarias de la aplicación.
- 5.1 Histogramas de los canales de color para la lámina de acetato.
- 5.2 Imágenes RGB y de canales de color para diferentes concentraciones de oxígeno simuladas.
- 5.3 Imágenes de *pseudocolor* de diferentes concentraciones de oxígeno equivalentes.
- 5.4 Gráfica de la evolución temporal de la concentración de oxígeno equivalente simulada.
- 5.5 Imagen en *pseudocolor* de la burbuja de aire en la muestra.

- A.1 Espacio de Cromaticidad CIE_{xy} 1931.
- A.2 Diferentes gamas según los espacios de color.
- A.3 Perfil del *Color Filter Array*.
- A.4 Diferentes distribuciones clásicas del CFA.

- B.1 Esquema de la distribución de un CFA.
- B.2 Diagrama de cuatro píxeles RGB.
- B.3 Distribución de los píxeles en el formato Bitmap.
- B.4 Salida del CFA. Canales de Color.

- C.1 Imagen de la cámara CCE-C013-U con y sin carcasa.

Acrónimos

| | |
|--------------|---|
| BGR: | <i>Blue, Green, Red.</i> Azul, Verde, Rojo. |
| <i>bmp:</i> | <i>Bitmap Image.</i> Imagen de Mapa de Bits. |
| <i>bpp:</i> | Bits por Pixel. |
| CCD: | <i>Charged-Coupled Device.</i> Dispositivo de Carga Acoplada. |
| CFA: | <i>Color Filter Array</i> (Bayer). Array de Filtros de Color. |
| CMOS: | <i>Complementary Metal Oxide Semiconductor.</i> Semiconductor Complementario de Óxido Metálico |
| <i>.dll:</i> | <i>Dinamic-link Library.</i> Librería Dinámica. |
| FDx: | <i>Frame Delegate (x).</i> |
| GPIO: | <i>Global Purpose Input-Output.</i> Entrada-Salida de Propósito General |
| MSB: | <i>Most Significant Bit.</i> Bit más significativo. |
| MSDN: | <i>Microsoft Developer Network.</i> |
| LED: | <i>Light-emitting diode.</i> Diodo emisor de luz. |
| LSB: | <i>Less Significant Bit.</i> Bit menos significativo |
| RGB: | <i>Red, Green Blue.</i> Rojo, Verde, Azul. |
| <i>raw:</i> | Formato de salida de imagen de la cámara. |
| SDK: | <i>Software Development Kit.</i> Kit de Herramientas de Desarrollo. |