



*Conceptualización de un estudio de la dispersión en microscopía confocal cromática por medio de procesamiento de imágenes digitales*

*Conceptualization of a study of dispersion in chromatic confocal microscopy by means of digital image processing*

*Conceptualização de um estudo de dispersão em microscopia confocal cromática através de processamento digital de imagens*

Martin Mateo Ramírez Márquez <sup>I</sup>  
[martin.ramirez@utelvt.edu.ec](mailto:martin.ramirez@utelvt.edu.ec)  
<https://orcid.org/0000-0002-2559-0372>

Jimmy Fernando Ramírez Márquez <sup>II</sup>  
[jimmy.ramirez@utelvt.edu.ec](mailto:jimmy.ramirez@utelvt.edu.ec)  
<https://orcid.org/0000-0002-9115-2813>

José Luis Castillo Gámez <sup>III</sup>  
[jose.castillo@utelvt.edu.ec](mailto:jose.castillo@utelvt.edu.ec)  
<https://orcid.org/0000-0001-7069-0404>

Galo Eduardo Maldonado Ibarra <sup>IV</sup>  
[galo.maldonado@utelvt.edu.ec](mailto:galo.maldonado@utelvt.edu.ec)  
<https://orcid.org/0000-0002-5309-5053>

**Correspondencia:** [martin.ramirez@utelvt.edu.ec](mailto:martin.ramirez@utelvt.edu.ec)

Ciencias Técnicas y Aplicadas  
Artículo de Investigación

\* **Recibido:** 17 de enero de 2025 \* **Aceptado:** 19 de febrero de 2025 \* **Publicado:** 24 de marzo de 2025

- I. Universidad Técnica Luis Vargas Torres de Esmeraldas, Ecuador.
- II. Universidad Técnica Luis Vargas Torres de Esmeraldas, Ecuador.
- III. Universidad Técnica Luis Vargas Torres de Esmeraldas, Ecuador.
- IV. Universidad Técnica Luis Vargas Torres de Esmeraldas, Ecuador.

## Resumen

Se realiza una conceptualización del artículo “*A study of dispersion in chromatic confocal microscopy using digital image Processing*”, el cual que introduce un procedimiento para microscopia cromática confocal por medio del uso de procesamiento de imágenes digitales para la determinación del índice de refracción de una placa semitransparente. Para esto el artículo introduce el concepto de OTM y se explica su validez como como una herramienta útil para determinar la cantidad de superficies que componen un material bajo análisis. Así el artículo describe la importancia del procesamiento de imágenes digitales en la microscopia confocal, abriendo grandes oportunidades a nivel académico para investigaciones futuras y posteriormente en aplicaciones prácticas.

**Palabras clave:** Microscopia confocal; procesamiento de imágenes.

## Abstract

This article presents a conceptualization of the article "A study of dispersion in chromatic confocal microscopy using digital image processing." This article introduces a procedure for confocal chromatic microscopy using digital image processing to determine the refractive index of a semitransparent plate. To this end, the article introduces the concept of OTM and explains its validity as a useful tool for determining the number of surfaces that comprise a material under analysis. The article thus describes the importance of digital image processing in confocal microscopy, opening up significant opportunities for future academic research and, subsequently, practical applications.

**Keywords:** Confocal microscopy; image processing.

## Resumo

É realizada uma conceptualização do artigo “*A scattering study in chromatic confocal microscopy using digital image processing*”, que introduz um procedimento para a microscopia cromática confocal através da utilização de processamento digital de imagens para a determinação do índice de refração de uma placa semitransparente. Para tal, o artigo introduz o conceito de OTM e explica a sua validade como uma ferramenta útil para determinar o número de superfícies que compõem um material em análise. O artigo descreve a importância do processamento digital de imagens na

microscopia confocal, abriendo oportunidades significativas para futuras pesquisas académicas e, posteriormente, aplicações práticas.

**Palavras-chave:** Microscopia confocal; processamento de imagem.

## **Introducción**

Aunque actualmente existen diversas aplicaciones para la microscopia cromática confocal (CCM) existen pocas o ninguna investigación enfocada en la determinación de la dispersión de un material usando procesamiento de imágenes digitales. El artículo analizado se enfoca en el desarrollo de un procedimiento nuevo que introduce el concepto de OTM como una herramienta útil para determinar la cantidad de superficies que componen un material bajo análisis.

El presente artículo tiene como objetivo hacer una breve conceptualización del procedimiento propuesto por los autores del artículo “A study of dispersion in chromatic confocal microscopy using digital image Processing”. Para esto el artículo hace una breve descripción del montaje propuesto y los conceptos introducidos como la OTM, su creación, función e interpretación., para finalmente concluir con las posibles áreas de estudio que se abren a partir de los aportes de esta investigación.

## **Desarrollo**

### **Sistema confocal cromático**

El montaje del sistema confocal está compuesto por cuatro subsistemas principales:

**Subsistema de iluminación:** Compuesto por una lámpara halógena, un objetivo de 20 ×, un pinhole de 50 μm y un objetivo de 10 ×. El objetivo de estos elementos es generar un haz colimado policromático.

**Subsistema de detección:** compuesto por un espectrómetro de fibra óptica y un objetivo de 10 ×.

**Subsistema de codificación de altura de longitud de onda:** formado por: una lente difractiva que genera el sistema de compresión y aberración cromática longitudinal, lo que permite ajustar el segmento de longitudes de onda a un rango de medida deseado.

**Subsistema de escaneo:** Utiliza una etapa de traducción motorizada nanométrica. El sistema confocal cromático utilizado tiene una resolución axial de 30-14 μm para una banda de luz de 510-690 nm.

En la aplicación utilizada en el artículo, una placa de material semitransparente se considera como muestra.

Para hacer la medición el sistema usa un cabezal óptico (Ver Figura 1) en el cual los componentes cromáticos se focalizan a lo largo del eje focal en puntos específicos. Si se realiza un barrido axial con un espejo plano, entonces es posible conocer la distribución de todos estos componentes espectrales en el eje focal, de esta manera se utiliza una curva de calibración, la cual consiste en un gráfico de la longitud de onda frente a la posición axial (la posición donde se localiza la longitud de onda).

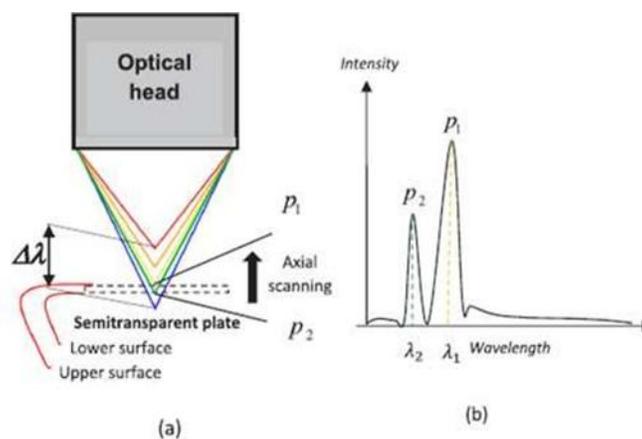


Figura 1. a) Material semitransparente dentro del segmento de longitud de onda  $\Delta\lambda$  b) la señal detectada por el sistema.

Al escanear la placa semitransparente con una superficie superior y otra inferior, como se muestra en la Figura 1, se identifican dos picos que representan los dos componentes espectrales que se focalizan en las superficies del material, el más corto está focalizado en la superficie inferior y el más largo en la superior.

El objetivo principal es, encontrar el índice de refracción del componente espectral que se refleja en la superficie inferior del material de cada espectro obtenido en cada posición axial, para lo cual el artículo identifica las relaciones matemáticas que se describen a continuación.

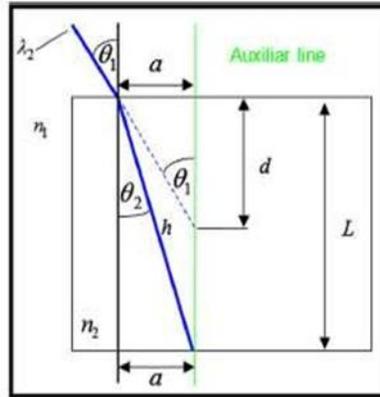


Figura 2. Geometría del problema.

Para esto los autores se basan en la Figura 2 donde es posible encontrar las expresiones matemáticas que permitan determinar el índice de refracción del material para cada componente espectral focalizada mediante el uso de la Ley de Snell.

Al identificar a  $\theta_1$  y  $\theta_2$  como los ángulos incidentes y de refracción respectivamente,  $n_1$  el índice de refracción del aire y  $n_2$  el índice de refracción del medio, entonces encuentran la ecuación a continuación por medio la geometría definida en Figura 2 (b).

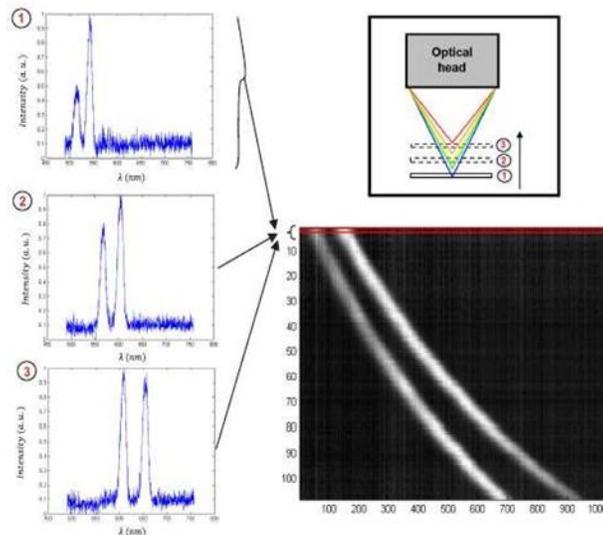


Figura 3. Escaneo axial y llenado de la matriz OTM mediante el espectro adquirido.

Como se puede observar, la OTM tiene información importante sobre el material que ha sido escaneado, cada tira está asociada a una superficie del material. En este caso el material tiene dos superficies (la inferior y la superior) y por eso hay dos tiras. Además, cada tira contiene los

componentes espectrales que están focalizados en la superficie. El ancho de cada tira está relacionado con el valor medio máximo de ancho completo (FWHM) de la respuesta espectral. Puesto que la OTM es una imagen de 256 niveles de gris, es posible extraer información relevante de ella mediante binarización. Las partes importantes de la imagen son regiones cuyos niveles de gris son muy altos (regiones más brillantes). Luego, se realiza un proceso de esqueletización con el fin de encontrar el máximo de intensidad. Se utilizan dos criterios: centro geométrico y centro de masa. El resultado es una imagen esqueletizada como la que se muestra en la Figura 4.

$$n_2 = (\sin^2 \theta_1 + \frac{L^2}{d^2} \cos^2 \theta_1)^{1/2}$$

Donde L es el espesor del material y d es la distancia a la cual el componente espectral  $\lambda_2$  se focaliza en ausencia del material.

### Procesamiento de imagen para la medición de dispersión del material

Una vez identificadas las relaciones matemáticas, el procedimiento consiste en un barrido axial de la muestra mediante un sistema de desplazamiento. Para cada desplazamiento, se adquiere el espectro relacionado con el punto axial, de manera que los datos de cada espectro serán una fila de una matriz que se denomina “matriz de espesor óptico” (OTM). Cada dato del espectro, antes de ser una fila del OTM, se normaliza y codifica en 256 niveles de gris, lo cual se indica en la Figura a continuación.

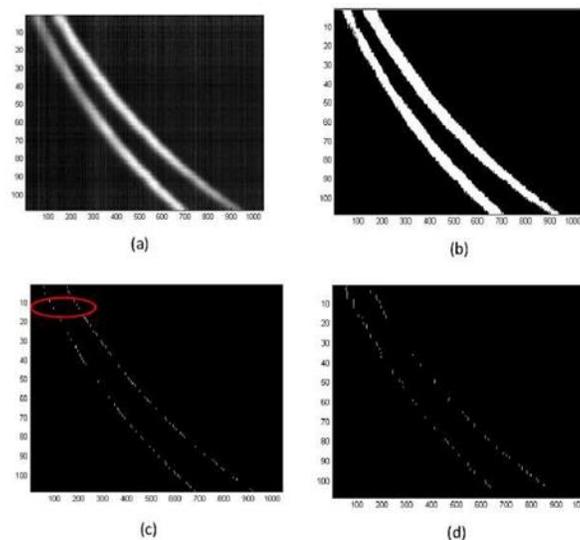


Figura 4. Procesamiento digital de la matriz OTM: (b) binarización (c) (d) esqueletización por criterio geométrico y esqueletización por criterio de máxima intensidad.

Una vez la imagen ha sido esquelizada es necesario obtener dos curvas de ajuste de OTM y OTM esquelizados. Para esto, los autores del artículo diseñaron un algoritmo que encuentra cada píxel blanco (nivel de gris = 1) que compone cada línea. Para cada píxel encontraron la longitud de onda y el punto axial relacionado con el mismo. La longitud de onda se obtiene del espectro original y para el punto axial tomaron el número de fila; y le restaron 1; finalmente el número resultante lo multiplican por el paso  $\Delta z$  que fue utilizado por el sistema de desplazamiento. Así obtuvieron los pares ordenados asociados a cada línea a la cual realizaron un proceso de ajuste para obtener una expresión matemática.

Una vez finalizado el proceso de ajuste, se puede obtener la longitud de onda del gráfico en función de la posición axial, como se muestra en la Figura 5, en donde la línea azul representa todos los componentes cromáticos que están focalizados en la superficie inferior del material durante el escaneo axial; mientras que el rojo se relaciona con los que se focalizan en la superficie superior.

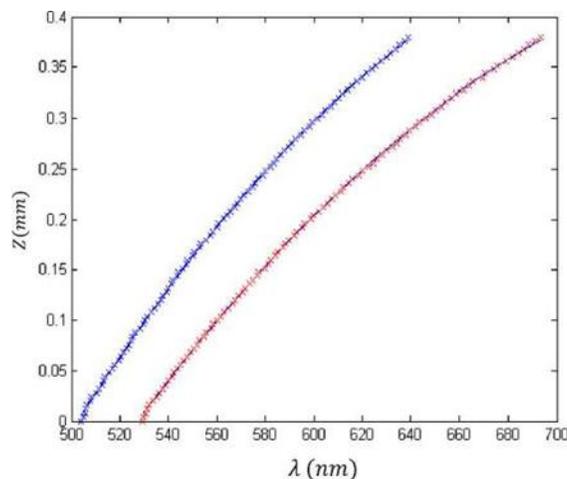


Figura 5. Grafica asociada a la OTM.

A la gráfica asociada obtenida en la Figura 5 es posible hacerle un corte horizontal o vertical para obtener la dispersión. Para el caso del corte horizontal a la OTM, el corte tendrá dos puntos de interceptación que están relacionados con las longitudes de onda  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ . El primer componente se focaliza en la superficie superior y el segundo en la inferior, y el índice de refracción se calcula utilizando la ecuación (1) para el último componente.

De la ecuación (1) se conocen todos los parámetros. En el caso de  $d$ , es necesario evaluar ambas longitudes de onda  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  en la curva de calibración y luego mirar el valor de la distancia entre

ellas. Esta es la forma en que se conoce el índice de refracción para  $\lambda_2$  en esta posición Z. El objetivo es seguir haciendo cortes horizontales sucesivos, para obtener la gráfica de índice de refracción versus longitud de onda, así se puede conocer la dispersión del material.

## Conclusiones

Aunque la microscopia confocal tiene como característica principal la propiedad de poder hacer discriminación con base a la profundidad, los autores del artículo proponen un método innovador que mantiene esta característica y adicionalmente evita movimiento axial del objeto. Por medio de la microscopia confocal cromática los autores proponen una aplicación para la identificación del índice de refracción en una placa semitransparente, la cual puede ser útil para aplicaciones como operaciones oftalmológicas (como las cataratas o inflamación de la córnea).

Para esto los autores proponen un procedimiento nuevo e introducen el concepto de OTM, matriz que contiene información importante como la cantidad de superficies que componen el material (relacionado con el número de tiras), estima el grosor óptico del material (asociado a la distancia entre píxeles de máximo nivel de gris) y estimación de la resolución axial del sistema (desde el ancho de las tiras).

Se concluye que la investigación tiene muchas áreas de seguimiento, entre ellas se menciona una limitación en el cálculo del índice de difracción introducido por la resolución axial del sistema actual (FWHM de 30-14  $\mu\text{m}$  para banda entre 510-690 nm), por lo cual se podrían reproducir los resultados con una resolución axial diferente.

El artículo demostró que la dispersión de un material se puede encontrar a partir de cortes sucesivos horizontales o verticales en la OTM, por lo cual se concluye que se podría aplicar en estudios sobre errores introducidos por la resolución axial del sistema. Adicionalmente, la metodología propuesta basada en el procesamiento de imágenes digitales abre muchas oportunidades en términos académicos para áreas de investigación en la microscopía confocal cromática por medio de procesamiento de imágenes digitales.

Por lo tanto, se concluye que el artículo es importante a nivel académico puesto que introduce el concepto de OTM y explica su validez, junto con el procesamiento de imágenes digitales en la microscopia confocal, abriendo grandes oportunidades a nivel académico y posteriormente en aplicaciones prácticas como las mencionadas anteriormente.

## Referencias

1. J. Garzon, “Montaje Confocal Cromatico. Laboratorio Metrologia Optica.” Universidad Pontificia Bolivariana, Medellin, 2020.
2. D. Duque, J. Garzón, and T. Gharbi, “A study of dispersion in chromatic confocal microscopy using digital image processing,” *Opt. Laser Technol.*, vol. 131, no. June 2019, p. 106414, 2020.

© 2025 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).