

Efecto de la distancia sonda – muestra en la aplicación de la espectroscopia de reflectancia difusa

S. Buendia Aviles^{1,2}, M. Cunill Rodríguez¹, J. A. Delgado Atencio¹, M. Muñoz Pérez¹, J. L. Arce Diego², F. Fanjul Vélez²

¹Grupo de Óptica Biomédica, Universidad Politécnica de Tulancingo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México, {sonia.buendia.1731023, margarita.cunill, jose.alberto, magda.munoz}@upt.edu.mx

²Grupo de Ingeniería Biomédica, Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Av. De los Castros 46, Santander, España, {arcedj, fanjulf}@unican.es, sonia.buendia@alumnos.unican.es

Resumen

La espectroscopia de reflectancia difusa (ERD) es una de las técnicas ópticas mínimamente o no invasivas empleadas por muchos autores por su facilidad de aplicación a nivel clínico. Entre sus aplicaciones se encuentra el diagnóstico de patologías diversas, en especial la detección de lesiones tumorales. En este trabajo se investiga la influencia de la distancia sonda-medio turbio en la forma y valores del espectro de reflectancia difusa registrado con una sonda comercial de fibras ópticas en fantomas de plastilina de tres colores: rojo, azul y verde. El montaje óptico experimental implementado estuvo conformado por una fuente de luz, un espectrómetro de fibra óptica y una sonda de fibras ópticas colocada ligeramente en contacto y perpendicular a la superficie de los fantomas. La distancia sonda-fantoma se varió mediante un mecanismo de desplazamiento micrométrico espacial, y se seleccionaron específicamente tres distancias: 1, 2 y 5 mm. Este estudio tiene un impacto directo en la aplicación clínica de la espectroscopia de reflectancia difusa, ya que en el entorno clínico es habitual que se produzcan variaciones en las distancias de aplicación, lo que puede tener una gran influencia en el resultado diagnóstico de la técnica.

1. Introducción

El estudio y aplicación de las metodologías ópticas no invasivas ha sido de gran interés en las últimas décadas especialmente por su amplio campo de aplicación. En particular la espectroscopia de reflectancia difusa (ERD) implementada mediante el uso de sondas ópticas ha sido utilizada en variadas aplicaciones biomédicas [1–5], ya que es relativamente sencilla y de menor complejidad para su implementación. La ERD se enfoca en el análisis de los espectros de reflectancia que se obtienen a través de la radiación electromagnética reflejada por una superficie como producto de la luz que incide sobre un medio, después de propagarse a través de este [6, 7]. Normalmente esta reflectancia puede ser de dos tipos: reflectancia especular o reflectancia difusa.

A partir del procesamiento de la información contenida en la luz reflejada difusamente de una superficie o tejido es posible inferir el estado y composición de una muestra, por esta razón, es importante registrar correctamente los espectros para evitar perder información de las muestras o en caso contrario, limitar la introducción de información ajena a las propiedades de la muestra. Dado que el cálculo del porcentaje de reflectancia (%R) se basa en una relación

entre un estándar y la medición de la muestra, ambos a una distancia específica, la más mínima modificación haría que todo el espectro cambiara. Es por ello por lo que la aplicación de la ERD implica diversas consideraciones y efectos a fin de garantizar la veracidad de los datos obtenidos. Por ejemplo, el efecto de la presión ejercida en tejidos *in-vivo* [8–11] y *ex-vivo* [12, 13], el ángulo de incidencia de la sonda [14–16], la distancia sonda-muestra [15, 17–20], la eficiencia de recolección en dependencia de la geometría de la sonda, y la distancia de detección (r) [21–24], pueden modificar significativamente el espectro adquirido. El análisis de la influencia de la distancia sonda-muestra ha sido abordado para intervalos de distancias (10–1000 μm) [14–16] donde es más frecuente la incidencia de este tipo de error durante la toma de espectros por parte de un operador humano, y menos frecuentemente reportado para distancias superiores a 1 mm. En este trabajo se evalúa el efecto de la distancia sonda-muestra para tres distancias sonda-fantoma: 1, 2 y 5 mm, categorizadas como distancias notables al ser más perceptibles, por lo que se espera sean de menor frecuencia en la práctica, pero determinantes para delimitar el rango máximo permitido de la distancia sonda-muestra durante la toma de espectros para muestras inertes y en base al montaje propuesto.

2. Materiales y métodos

2.1 Montaje experimental para el registro de los espectros

La Fig. 1 muestra el montaje óptico experimental para llevar a cabo las mediciones de los espectros de reflectancia difusa, los cuales se registran mediante un espectrómetro de fibra óptica (BLK-CXR-SR-50, StellarNet Inc., USA) al cual se le acopló, en su puerto óptico de entrada, uno de los extremos de una sonda bifurcada de fibras ópticas (R600-8-UV/VIS-SR, StellarNet Inc., USA). El otro extremo de la sonda se acopló a una fuente de luz de deuterio-tungsteno (Hamamatsu L10671, Hamamatsu Photonics, Japan) que presenta una emisión espectral en la región UV-visible-IR (200–1600 nm). El extremo común de la sonda se colocó en ligero contacto con la superficie de los fantomas de plastilina durante las mediciones espectrales. Para ello los fantomas se posicionaron debajo del extremo común de la sonda mediante una plataforma plana metálica. La

distancia sonda-superficie de los fantasmas se varió por medio de una plataforma micrométrica con desplazamientos XYZ (RB13M/M, Thorlabs, Newton, NJ, USA).

Los detalles cuantitativos y de la geometría de la sonda de fibras ópticas utilizada, así como el procedimiento y características de los fantasmas implementados, corresponden a los reportados en [19]. Para ello se emplearon tres fantasmas de 180 gramos elaborados a base de plastilina azul, verde y roja en forma de cilindros de 6 cm x 3.5 cm.

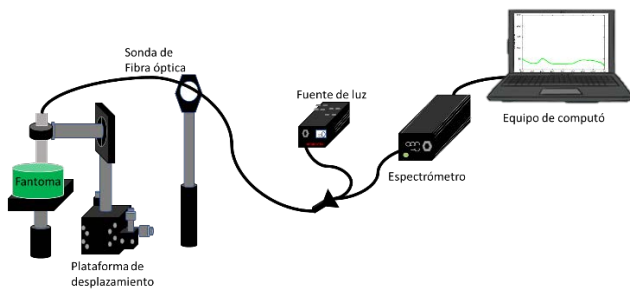


Figura 1. Instalación experimental implementada en la toma de espectros de reflectancia difusa en fantasmas de plastilina.

2.2 Registro de los espectros de reflectancia difusa

Los espectros de reflectancia difusa fueron adquiridos con un tiempo de integración de 500 milisegundos, 5 lecturas promediadas y 4 píxeles de suavizado. Los parámetros de adquisición se mantuvieron fijos en todas las mediciones. En total se efectuaron 4 mediciones para cada distancia establecida y fueron promediadas para su presentación gráfica. Primero se capturaron las curvas espectrales en contacto con la superficie de cada plastilina, colocando la sonda gentilmente en el centro de ellas y posteriormente la sonda se desplazó verticalmente hacia arriba manipulando el mecanismo de desplazamiento lineal a lo largo del eje Z de la plataforma micrométrica estableciendo los valores 1, 2 y 5 mm.

3. Resultados y discusión

En las Fig. 2 aparece el resultado de los espectros de reflectancia difusa obtenidos experimentalmente para los tres tipos de fantasmas (azul, verde y rojo) cuando la distancia sonda-fantomas se estableció en los tres valores especificados previamente (1, 2 y 5 mm), además del espectro promedio obtenido para las mediciones realizadas en contacto. Se observa que la firma espectral (la forma y posición característica) de las curvas de reflectancia difusa para un mismo tipo de fantoma es muy similar para las tres distancias sonda-fantoma utilizadas. Es importante resaltar que la forma de estas curvas es semejante a las obtenidas en [19] para otro conjunto de distancias sonda-fantomas (10, 20, 30, 50, 100, 500 μm), motivo por el cual es posible observar las bandas espectrales características de cada uno de los fantasmas. Como puede apreciarse los máximos de reflexión difusa de los tres tipos de fantasmas concuerdan

bastante bien con los máximos de las curvas espectrales de reflexión de pigmentos de color azul, verde y rojo [25].

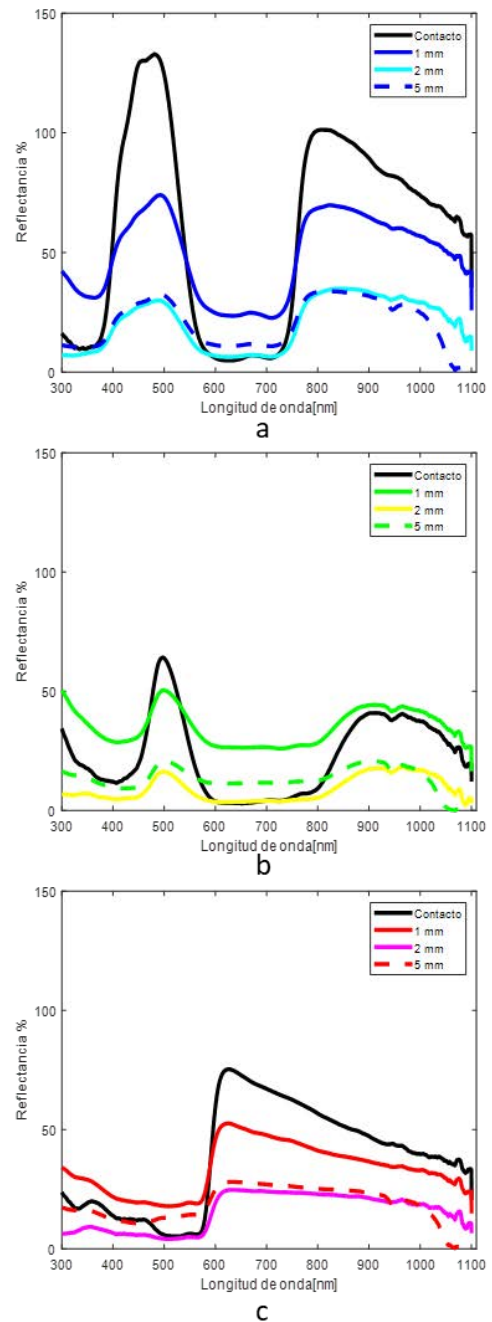


Figura 2. Curvas espectrales obtenidas a las distancias sonda-muestra de 1, 2 y 5 mm para tres fantasmas de plastilina: a) espectros correspondientes a la plastilina azul, b) espectros correspondientes a la plastilina verde y c) espectros correspondientes a la plastilina roja.

Si bien la distancia sonda-muestra no afectó la forma de los espectros, no fue así con el porcentaje de reflectancia. Como se puede apreciar la mayoría de los casos registró una menor reflectancia en comparación a la registrada en contacto con la muestra, especialmente en las bandas características para cada plastilina [19]. De manera semejante se observó generalmente un menor porcentaje de reflectancia difusa (%R) para una separación sonda fantoma de 2 mm, contrario a lo esperado, dado que se podría suponer una disminución del %R conforme al

incremento en la distancia sonda-fantoma. No obstante, el %R obtenido a 5 mm fue siempre ligeramente superior al registrado a 2 mm, pero inferior respecto de las mediciones realizadas en contacto y a 1 mm. Esto podría ser debido a las propiedades de esparsimiento de estas muestras y su relación con la apertura numérica de las fibras ópticas.

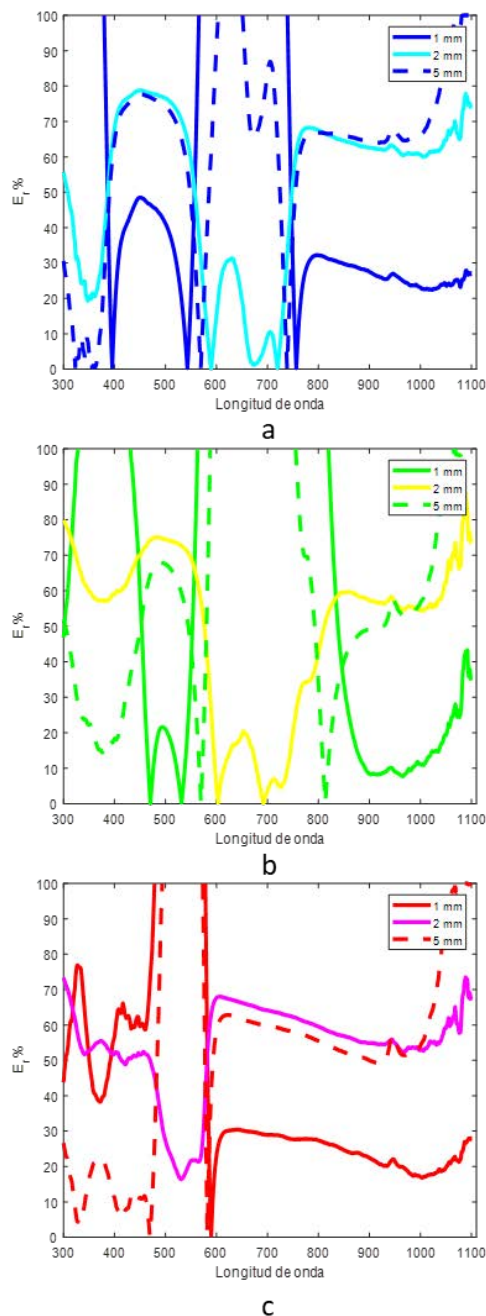


Figura 3. Gráficas correspondientes al cálculo del error relativo porcentual de las mediciones realizadas a una distancia sonda-muestra de 1, 2 y 5 mm respecto a las curvas espectrales obtenidas en contacto: a) E_r (%) para la plastilina azul, b) E_r (%) para la plastilina verde y c) E_r (%) para la plastilina roja.

Con la finalidad de corroborar los resultados anteriores se realizó el cálculo del error relativo porcentual (E_r (%)). Este análisis confirma que a mayor distancia entre la muestra y la superficie de medición el porcentaje de error relativo porcentual (E_r %) aumenta significativamente, aunque existe una mínima diferencia entre los valores

obtenidos a 2 y 5 mm, siendo ligeramente inferior el E_r (%) para 5 mm. Estos resultados se corresponden con el análisis de las gráficas de las curvas espectrales previamente descrito. Por lo tanto, en este estudio se obtuvieron errores relativos porcentuales de magnitudes elevadas respecto a las mediciones realizadas en contacto. Un aspecto relevante es que para las tres muestras se obtuvo un menor error relativo porcentual para la región del infrarrojo cercano respecto de la región visible, sin embargo, estos aún continúan siendo valores considerables.

Por otra parte, se obtuvo que los valores del E_r (%) fueron siempre menores para la plastilina roja respecto a los otros dos fantasmas, tal y como es posible observar en la Figura 3-c), cuya banda espectral característica concuerda con la región de las longitudes correspondientes al infrarrojo cercano del espectro electromagnético.

En algunos trabajos previos se identificó la existencia de un crecimiento monótonico del %R para distancias sonda-piel entre 0 y 1000 μm . Sin embargo, este incremento no es igual para todas las regiones anatómicas de medición [18], mientras que otros autores coinciden que este crecimiento es perceptible solo para mediciones de distancia sonda-tejido inferiores a 500 μm , y decrecen para distancias superiores [20]. De manera semejante los resultados obtenidos en este trabajo en comparación a los previamente obtenidos y reportados en [19] muestran que existe un crecimiento significativo del %R en las mediciones espectrales realizadas sobre fantasmas de plastilina cuando se varía la distancia sonda-fantoma entre 0 y 50 μm , siendo a 50 μm donde se obtuvo el máximo %R para todas las muestras de plastilina usadas. Sin embargo, para distancias inferiores a 30 μm y superiores a 1 mm el %R que se obtiene para la plastilina roja es inferior a la obtenida en contacto, comportamiento que no ocurre en las plastilinas verde y azul.

Los resultados presentados permiten corroborar que, si bien la distancia sonda-muestra para superficies inertes no altera la firma espectral de la muestra, el porcentaje de reflectancia difusa obtenido es susceptible a estas variaciones, tal como se reporta para rangos de distancias sonda-muestra inferiores en muestras inertes [19]. En consecuencia, los resultados de este trabajo contribuyen a ampliar el rango de distancias bajo análisis, elemento fundamental en la práctica clínica con objeto de obtener medidas que permitan realizar un diagnóstico adecuado basado en espectros de reflectancia.

4. Conclusiones

En este estudio los resultados muestran que la distancia entre la sonda multi-fibra usada en nuestro montaje experimental garantiza que se mantenga la firma espectral de los fantasmas de plastilina azul, verde y roja implementados en este trabajo. Sin embargo, los errores introducidos por un operador para la distancia sonda-muestra para este tipo de mediciones deben permanecer por debajo de 1 mm, siendo el mínimo posible dado que el porcentaje de reflectancia difusa para las bandas relevantes de información se pueden ver comprometidas para distancias superiores, especialmente cuando se traslada a aplicaciones in-vivo para la discriminación de tejidos.

Estos resultados son particularmente interesantes en fantasmas de plastilina de color rojo, al ser los fantasmas con mejor respuesta espectral, ya que su firma espectral tiene un comportamiento más parecido a la hemoglobina en la región visible del espectro. Como trabajo futuro se plantea reproducir este estudio para evaluar los resultados sobre tejido *in vivo*.

Agradecimientos

Este Trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i “Cribado diagnóstico de microorganismos mediante microscopía avanzada e inteligencia artificial en patologías humana” (PID2021-127691OB-I00), del Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciado con fondos FEDER.

Referencias

- [1] F. Fanjul-Vélez, S. Pampín-Suárez, y J. L. Arce-Diego, “Application of Classification Algorithms to Diffuse Reflectance Spectroscopy Measurements for Ex Vivo Characterization of Biological Tissues”, *Entropy*, vol. 22, núm. 7, Art. núm. 7, jul. 2020, doi: 10.3390/e22070736.
- [2] G. Zonios y A. Dimou, “Modeling diffuse reflectance from semi-infinite turbid media: application to the study of skin optical properties”, *Opt. Express*, vol. 14, núm. 19, pp. 8661–8674, sep. 2006, doi: 10.1364/OE.14.008661.
- [3] S. F. Malin, T. L. Ruchti, T. B. Blank, S. N. Thennadil, y S. L. Monfre, “Noninvasive Prediction of Glucose by Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy”, *Clin. Chem.*, vol. 45, núm. 9, pp. 1651–1658, sep. 1999, doi: 10.1093/clinchem/45.9.1651.
- [4] D. C. G. de Veld, M. Skurichina, M. J. H. Witjes, R. P. W. Duin, H. J. C. M. Sterenborg, y J. L. N. Roodenburg, “Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for oral oncology”, *Lasers Surg. Med.*, vol. 36, núm. 5, pp. 356–364, 2005, doi: 10.1002/lsm.20122.
- [5] F. Fanjul-Vélez, L. Arévalo-Díaz, y J. L. Arce-Diego, “Intra-class variability in diffuse reflectance spectroscopy: application to porcine adipose tissue”, *Biomed. Opt. Express*, vol. 9, núm. 5, pp. 2297–2303, may 2018, doi: 10.1364/BOE.9.002297.
- [6] H. Yavari, “Diffuse Reflectance Spectroscopy: Using Multivariate analysis method for determination of tissue optical properties”, 2016, Consultado: el 1 de septiembre de 2022. [En línea]. Disponible en: <http://lup.lub.lu.se/student-papers/record/8880115>
- [7] G. Kortüm, *Reflectance Spectroscopy: Principles, Methods, Applications*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [8] Y. Ti y W.-C. Lin, “Effects of probe contact pressure on in vivo optical spectroscopy”, *Opt. Express*, vol. 16, pp. 4250–62, abr. 2008, doi: 10.1364/OE.16.004250.
- [9] J. A. Delgado Atencio *et al.*, “Influence of probe pressure on human skin diffuse reflectance spectroscopy measurements”, *Opt. Mem. Neural Netw.*, vol. 18, pp. 6–14, mar. 2009, doi: 10.3103/S1060992X09010020.
- [10] S. Hariri Tabrizi y A. Shakibaei, “The Effect of Probe Pressure on In Vivo Single Fiber Reflectance Spectroscopy”, *J. Lasers Med. Sci.*, vol. 7, pp. 233–237, oct. 2016, doi: 10.15171/jlms.2016.41.
- [11] A. P. Popov, A. V. Bykov, y I. V. Meglinski, “Influence of probe pressure on diffuse reflectance spectra of human skin measured in vivo”, *J. Biomed. Opt.*, vol. 22, núm. 11, p. 110504, nov. 2017, doi: 10.1117/1.JBO.22.11.110504.
- [12] M. Bregar, B. Cugmas, F. Pernuš, B. Likar, y M. Bürmen, “A study on the properties of contact pressure induced by manually operated diffuse reflectance fiber optic probes”, *Prog. Biomed. Opt. Imaging - Proc. SPIE*, vol. 9327, mar. 2015, doi: 10.1117/12.2077190.
- [13] X. U. Zhang, D. J. Faber, T. G. V. Leeuwen, y H. J. C. M. Sterenborg, “Effect of probe pressure on skin tissue optical properties measurement using multi-diameter single fiber reflectance spectroscopy”, *J. Phys. Photonics*, vol. 2, núm. 3, p. 034008, jun. 2020, doi: 10.1088/2515-7647/ab9071.
- [14] A. I. Mundo *et al.*, “Diffuse reflectance spectroscopy to monitor murine colorectal tumor progression and therapeutic response (Erratum)”, *J. Biomed. Opt.*, vol. 25, núm. 4, p. 049803, abr. 2020, doi: 10.1117/1.JBO.25.4.049803.
- [15] B. Wang, S. Fan, L. Li, y C. Wang, “Study of probe-sample distance for biomedical spectra measurement”, *Biomed. Eng. Online*, vol. 10, p. 95, nov. 2011, doi: 10.1186/1475-925X-10-95.
- [16] S. Buendía Aviles, M. Cunill Rodríguez, J. A. Delgado Atencio, J. L. A. Diego, y F. Velez Fanjul, “Análisis diagnóstico de afecciones cutáneas mediante el uso de Espectroscopía de Reflectancia Difusa”, 2019.
- [17] T. Papaioannou *et al.*, “Effects of Fiber-Optic Probe Design and Probe-to-Target Distance on Diffuse Reflectance Measurements of Turbid Media: An Experimental and Computational Study at 337 nm”, *Appl. Opt.*, vol. 43, pp. 2846–60, jun. 2004, doi: 10.1364/AO.43.002846.
- [18] A. E. Martínez Rodríguez, “Estudio experimental de la influencia de la distancia sonda-piel en la métrica de los espectros de reflexión difusa”, p. 90.
- [19] S. Buendía Aviles, “Impacto de la distancia sonda-muestra en la aplicación de la espectroscopía de reflectancia difusa”, presentado en 3er Congreso Nacional de Cuerpos Académicos de Investigación y Posgrado, Universidad Politécnica del Estado de Morelos, el 6 de julio de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://congreso.upemor.edu.mx/>
- [20] A. I. Mundo *et al.*, “Diffuse reflectance spectroscopy to monitor murine colorectal tumor progression and therapeutic response”, *J. Biomed. Opt.*, vol. 25, núm. 3, p. 035002, mar. 2020, doi: 10.1117/1.JBO.25.3.035002.
- [21] P. R. Bargo, S. A. Prahl, y S. L. Jacques, “Collection efficiency of a single optical fiber in turbid media”, *Appl. Opt.*, vol. 42, núm. 16, pp. 3187–3197, jun. 2003, doi: 10.1364/AO.42.003187.
- [22] R. Hennessy, W. Goth, M. Sharma, M. Markey, y J. Tunnell, “Effect of probe geometry and optical properties on the sampling depth for diffuse reflectance spectroscopy”, *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, p. 107002, oct. 2014, doi: 10.1117/1.JBO.19.10.107002.
- [23] I. Fridolin y L.-G. Lindberg, “Optical non-invasive technique for vessel imaging: I. Experimental results”, *Phys. Med. Biol.*, vol. 45, pp. 3765–78, ene. 2001, doi: 10.1088/0031-9155/45/12/318.
- [24] C. Reble, I. Gersonde, S. Schanzer, M. C. Meinke, J. Helfmann, y J. Lademann, “Evaluation of detection distance-dependent reflectance spectroscopy for the determination of the sun protection factor using pig ear skin”, *J. Biophotonics*, vol. 11, núm. 1, p. e201600257, 2018, doi: 10.1002/jbio.201600257.
- [25] E. Hecht, *Optica*. Addison-Wesley Iberoamericana Espana, S.A., 2001. [En línea]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=XdCaQQAACA-AJ>