ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



### Proyecto Fin de Carrera

### Evaluación de sistemas ópticos para la captación de reflectancia difusa (Evaluation of optical systems for the acquisition of diffuse reflectance)

Para acceder al Título de

### INGENIERO DE TELECOMUNICACIÓN

Autor: Jhoe Francisco Pacheco Vásquez

**Octubre - 2015** 



E.T.S. DE INGENIEROS INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACION

### INGENIERÍA DE TELECOMUNICACIÓN

### CALIFICACIÓN DEL PROYECTO FIN DE CARRERA

Realizado por: Pacheco Vásquez, Jhoe Francisco.

Director del PFC: Real Peña, Eusebio y Conde Portilla, Olga María.

- Título: "Evaluación de sistemas ópticos para la captación de reflectancia difusa".
- Title: "Evaluation of optical systems for the adquisition of diffuse reflectance".

### Presentado a examen el día: 29 de Octubre

para acceder al Título de

### INGENIERO DE TELECOMUNICACIÓN

Composición del Tribunal:

Presidente (Apellidos, Nombre): Quintela Incera, Antonio. Secretario (Apellidos, Nombre): Conde Portilla, Olga María. Vocal (Apellidos, Nombre): Ugarte Olano, Iñigo.

Este Tribunal ha resuelto otorgar la calificación de: .....

Fdo.: El Presidente

Fdo.: El Secretario

Fdo.: El Vocal

Fdo.: El Director del PFC (sólo si es distinto del Secretario)

Vº Bº del Subdirector

Proyecto Fin de Carrera Nº (a asignar por Secretaría)

"No hay que apagar la luz del otro para lograr que brille la nuestra."

- Mahatma Gandhi

## Palabras clave

Reflectancia difusa, espectroscopia visible, parámetros de absorción, parámetros de esparcimiento, espectro, ventana terapéutica, espacio de color.

## Dedicatoria

Dedicado a mis padres, pilares fundamentales en mi vida. Sus virtudes y su lucha insaciable de progreso han hecho que les tenga en un altar, un ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí, sino para mi familia en general.

> También se lo dedico a mi hermana Rosse Meri, fuente de inspiración y modelo a seguir, siempre te tendré como referente.

Por último, quiero dedicárselo a mi novia, Mi Reina, por su apoyo en momentos de decline.

### Agradecimientos

Este es el momento que he esperado con tantas ansias para expresar mi gratitud a todas las personas que me han ayudado, apoyado, animado y facilitado las cosas desde mi llegada a España, para luchar por un sueño que hoy veo prácticamente cumplido.

En primer lugar, agradecer a mi tutora de proyecto, Olga Conde, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, con el que he ampliado conocimientos y a Eusebio por ayudarme a sacar este proyecto hacia adelante que me ha permitido superar el último escalón de esta carrera. Ha sido un placer trabajar con el apoyo de ambos.

Agradecer a mi familia que es lo más importante que tengo. A mis tíos/as, primos/as, sobrinos (Iker y Asier), amistades y sobretodo a mis padres, Francisco y María Violeta, por darme mucho más de lo que necesitaba o quizá mucho más de lo que se podían permitir, gracias por apoyarme y seguir apoyándome. También a mis hermanitos pequeños, Edison y Geraldine, por su paciencia durante la carrera y sobretodo en fechas de exámenes. A mi hermano mayor, Edwin, por demostrarme que siempre hay una buena salida cuando se tiene fé, a pesar de las adversidades, y a ti hermanita, Rosse Meri, que para agradecerte lo que has hecho por mi tendría que hacer otro proyecto, así que lo voy a resumir en una frase: "Gracias por todo". De igual forma agradecer a mi cuñado, Rubi, por sus consejos y por orientarme a hacer esta carrera. También quiero dar las gracias a mi novia por su apoyo incondicional estos últimos años, gracias Gianina.

A mis compañeros amigos, ese grupo de primero con el que empecé esta aventura, Oscar, Irene y Javier, que empezó como un grupo de biblioteca, donde hemos pasado los mejores momentos, peores para los que estudiaban al lado, es lo que tiene la ETSIIT. A los amigos que he ido haciendo durante la carrera, Carlos, Diego, Pablo, Dani, Jaime, Bedoya y muchos otros más, que han hecho de esta carrera; una carrera amena, entretenida y llevadera.

A la gente que lea este proyecto y no entienda nada, porque la intención es lo que cuenta o eso dicen.

A los que abran este libro solo para leer los agradecimientos o ver el número de páginas.

Gracias.

# Índice general

Pε	alabr	as clav	e							IV
Dedicatoria										
Ag	grade	ecimieı	ntos							VI
Ín	dice	genera	1							VII
Ín	dice	de figu	iras							x
Ín	dice	de tab	las						2	XIV
1.	Intr	oducci	ón y estructura del proyecto							1
	1.1.	Estruc	tura de la memoria							1
	1.2.	Introd	ucción	•						2
2.	Inte	eracció	n Luz-materia							8
	2.1.	Tipos	de interacción							9
		2.1.1.	Reflexión							9
		2.1.2.	Transmisión							11
		2.1.3.	Absorción							13
		2.1.4.	Esparcimiento o Scattering							14
	2.2.	Intera	cción luz-tejido biológico							17
	2.3.	Reflec	tancia difusa en los tejidos biológicos	•	•				•	23
3.	Mat	teriales	s y Metodología							26
	3.1.	Mater	m iales							26
		3.1.1.	Muestras							26
			3.1.1.1. Tejidos Biológicos							26
		3.1.2.	Banco de medida							27
			3.1.2.1. Espectrómetro							27

		$3.1.2.2.$ Motores y controladora $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 3.3$	1
		3.1.2.3. Fuentes de Luz	2
		3.1.2.4. Fibra óptica $\ldots \ldots 33$	3
		$3.1.2.5.$ Lente biconvexa $\ldots$ $3.3.3.3$	5
		3.1.2.6. Lente colimadora	7
		$3.1.2.7.$ Material de referencia $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 39$	9
	3.2.	Metodología	0
		3.2.1. Configuración del puerto serie: RS-232 $\dots \dots \dots$	0
		3.2.2. Calibración de los motores $\ldots \ldots 4$	1
		3.2.3. Calibración del espectrómetro $\dots \dots \dots$	2
		3.2.4. Corrección de los espectros	3
		3.2.5. Obtención del diámetro de spot $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 44$	4
		3.2.6. Medidas con desplazamiento XY $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 4$	7
		3.2.7. Sistema automatizado $\ldots \ldots 44$	8
4.	Siste	emas de Captación 50	6
	4.1.	Introducción	6
	4.2.	Captación con fibra óptica al aire	7
	4.3.	Captación con Colimador	0
	4.4.	Captación con Lente Biconvexa	2
	4.5.	Captación con Lente Biconvexa y Colimador	4
	4.6.	Área de captación óptima $\dots \dots \dots$	5
5.	Desa Boff	arrollo de una interfaz gráfica en Matlab para la medida y análisis de ectancia Difusa	7
	5.1.	GUI de Matlab usada para desarrollar la Interfaz	8
		5.1.1. Acerca de Matlab $\ldots$	8
		5.1.2. Interfaz gráfica. GUI	8
		5.1.2.1. Propiedades de los objetos $\ldots \ldots \ldots$	8
		5.1.2.2. Controles de la interfaz gráfica de usuario	9
		5.1.3. Elaboración de la Interfaz gráfica	9
	5.2.	Interfaz Gráfica Reflectancia Difusa	0
		5.2.1. Introducción	0
		5.2.2. Información que debe conocer el usuario antes de iniciar la interfaz Gráfica 70	0
		5.2.2.1. Ubicación de los archivos y versiones de MATLAB	0
		5.2.2.2. Organización del Cd de datos	1
		5.2.2.3. Localización de las carpetas desde el Current Directory de MATLAB 7	'1

		5.2.3.	Hitos pr	incipales en el uso de la interfaz gráfica	71
			5.2.3.1.	Pantalla Principal	72
			5.2.3.2.	Calibración Captura	73
			5.2.3.3.	Análisis	76
6.	Pres	stacior	nes de lo	s sistemas de captación y análisis de los resultados	77
	6.1.	Presta	ciones de	los sistemas de captación	77
		6.1.1.	Caracter	ización de la calidad de imagen	77
			6.1.1.1.	Resolución	77
			6.1.1.2.	Contraste	79
			6.1.1.3.	Carta de prueba USAF 1951	80
		6.1.2.	Prestacio	ones de los sistemas de captación utilizados	82
	6.2.	Medid	a de la m	uestra biológica	87
		6.2.1.	Análisis	$espectral simple \ldots \ldots$	87
		6.2.2.	Análisis	$\operatorname{multiespectral}$	89
		6.2.3.	Reconstr	ucción de color	90
			6.2.3.1.	Espacios de representación de color CIE XYZ 1931	90
			6.2.3.2.	Resultados	93
7.	Con	clusio	nes y lín	eas futuras	95
	7.1.	Conclu	usiones .		95
	7.2.	Líneas	futuras .		96
Bi	bliog	grafía			97

# Índice de figuras

1.1.	Espectro electromagnético.	2
1.2.	Ventana terapéutica (600-1400 nm) e interacción de las longitudes de onda del espectro electromagnético con los tejidos biológicos	3
1.3.	Espectroscopia con contacto.	5
1.4.	Fibra con varios haces	6
1.5.	Espectros en absorción de hemoglobina oxigenada $(HbO_2)$ , desoxigenada $(Hb)$ , grasa y agua.	6
2.1.	Formación del color (blanco y negro)	8
2.2.	Reflexión especular	10
2.3.	Reflexión compuesta.	11
2.4.	Reflexión difusa.	11
2.5.	Reflexión mixta.	11
2.6.	Transmisión regular.	12
2.7.	Transmisión difusa	12
2.8.	Transmisión mixta	12
2.9.	Antrisopía de scattering $(g)$ relacionado con la función de fase de scattering (SPF).	16
2.10.	Ángulo de <i>scattering</i>	17
2.11.	Esquema de reflexión difusa, transmisión y absorción de la luz.	17
2.12.	Espectro de absorción de la melanina.	18
2.13.	Izquierda, estructura de la piel. Derecha, espectro de absorción de la grasa.	19
2.14.	Espectro de absorción la hemoglobina. Rosa, espectro de la deoxihemoglobina $(Hb)$ y azul, el espectro de la oxihemoglobina $(HbO_2)$ .	20
2.15.	Espectro de absorción del agua	20
2.16.	Coeficiente de absorción de distintos tejidos biológicos. Se indica la 'ventana te- rapéutica'( <i>Diagnostic window</i> )	21
2.17.	Coeficiente de esparcimiento, <i>scattering</i> , en función del tamaño de las partículas del medio.	22
2.18.	Célula y orgánulos. (B) <i>Scattering</i> de Rayleigh producido por los orgánulos. El ángulo indica la desviación de la luz incidente.	23

2.19.	Esquema básico de un montaje para la medida de reflexión difusa	24
3.1.	Muestra de la carne picada.	27
3.2.	Espectrómetro HR2000CG-UV-NIR (imagen del fabricante)	28
3.3.	Esquema del espectrómetro utilizado	28
3.4.	Sensibilidad espectral del sensor CCD del espectrómetro	29
3.5.	Controladora SMC Pollux (imagen del fabricante).	31
3.6.	Motor VT-80 2SM MLS (imagen del fabricante).	32
3.7.	Fuente hálogena.	33
3.8.	Fotografía de la fuente con el elemento que produce iluminación en una línea	33
3.9.	Atenuación de la fibra óptica P300-1-SR	34
3.10.	Fibra óptica P300-1-SR (imagen del fabricante)	34
3.11.	Apertura numérica	35
3.12.	Lente biconvexa N-BK7	36
3.13.	Características de una lente biconvexa convergente	37
3.14.	Transmisión de la lente en función de la longitud de onda	37
3.15.	Montura LMR 1/M del fabricante thorlabs. $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$	37
3.16.	Lente colimador F220SMA-A	38
3.17.	Formato Comercial del Spectralon (imagen del fabricante)	39
3.18.	Datos de reflectancia del Spectralon en la escala de grises	39
3.19.	Salida de Matlab para la configuración del puerto.	40
3.20.	Configuración actual de uno de los controladores	41
3.21.	(Izquierda) Espectro de la fuente de luz halógena. (Derecha) Ruido de fondo. $\ $	43
3.22.	Posiciones del spot sobre la muestra Blanco-Negro.	45
3.23.	Captura de la muestra blanco-negro para un spot pequeño.	45
3.24.	Captura de la muestra blanco-negro para un spot grande.	46
3.25.	Función de Distribución Acumulativa para la distribución normal	46
3.26.	Tres formas diferentes de medir el área bajo la curva normal. $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$	47
3.27.	Diagrama de flujo para la configuración del puerto.	49
3.28.	Diagrama de flujo para la calibración de los motores.	50
3.29.	Diagrama de flujo para la calibración del espectrómetro	51
3.30.	Diagrama de flujo para la obtención del diámetro de spot	52
3.31.	Diagrama de flujo para el desplazamiento XY de los motores.	53
3.32.	Diagrama de flujo para el sistema automatizado.	54
3.33.	Esquema del montaje.	55

4.1.	Diámetro de spot teórico.	57
4.2.	Montaje para calcular el diámetro de spot con fibra.	58
4.3.	Diámetro de spot de la fibra. Negro: Teórico (óptica geométrica). Azul: Ancho (5-95%). Rojo: Ajuste de la fda (5-95%). Verde: ajuste de la fda a 2*1.65*sigma	58
4.4.	Potencia acoplada en función del ángulo	59
4.5.	Potencia normalizada en función de la distancia fibra-muestra	59
4.6.	Montaje para calcular el diámetro de spot con una lente colimadora. $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$	60
4.7.	Ángulo de aceptancia de la fibra v s ángulo de aceptancia del colimador. $\ldots$ . $\ldots$	60
4.8.	Diámetro de spot del colimador. Azul: Ancho (5-95 %). Rojo: Ajuste de la fda $(5-95 \%)$ . Verde: ajuste de la fda a $2*1.65*$ sigma	61
4.9.	Potencia normalizada en función de la distancia colimador-muestra	61
4.10.	Medida experimental de la distancia focal	62
4.11.	Montaje para calcular el diámetro de spot con una lente biconvexa-fibra	63
4.12.	Diámetro de spot de la fibra a la muestra mediante una lente biconvexa. Negro: Teórico (óptica geométrica). Azul: Ancho (5-95 %). Rojo: Ajuste de la fda (5- 95 %). Verde: ajuste de la fda a 2*1.65*sigma	63
4.13.	Potencia normalizada en función de la distancia fibra-(lente)-muestra.	64
4.14.	Montaje para calcular el diámetro de spot con una lente biconvexa-colimador	64
4.15.	Diámetro de spot del colimador a la muestra mediante una lente biconvexa. Azul: Ancho (5-95%). Rojo: Ajuste de la fda (5-95%). Verde: ajuste de la fda a 2*1.65*sigma	65
4.16.	Potencia normalizada en función de la distancia colimador-(lente)-muestra	66
4.17.	Esquema del área de captación y distancia entre espectros. a) óptica geométrica (teoría), b) medidas.	66
5.1.	Iniciación de MatLab Guide	70
5.2.	Directorio Principal de Matlab para ejecutar la Interfaz.	71
5.3.	Ejecución de la interfaz gráfica	72
5.4.	Pantalla principal de la interfaz	72
5.5.	Funciones disponibles en la pantalla principal.	73
5.6.	Pantalla de Calibración Captura.	73
5.7.	Pantalla de calibración nueva	74
5.8.	Superior: potencia normalizada para desplazamientos del motor y ajuste por fun- ción de Distribución Acumulativa. Inferior: error de ajuste (residuos)	75
5.9.	Pantalla de calibración nueva con todos los controles	75
5.10.	Pantalla de Análisis	76
6.1.	Relación de la línea de par con una señal cuadrada	78
6.2.	Imagen con diferentes resoluciones	78

6.3.	Escenarios de imágenes donde (a) la línea de par no se resuelve y (b) la línea de par se resuelve	78
6.4.	Contraste en relación con píxeles	79
6.5.	Comparación de contraste al aumentar la frecuencia	80
6.6.	Prueba de resolución de USAF 1951	81
6.7.	Poder de resolución del elemento	82
6.8.	Capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$	82
6.9.	Ejemplo de región de captura (spot) capturando simultáneamente regiones negras (A) y blanca (B)	83
6.10.	Captación de las capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 para el sistema de captación con fibra. Izquierda, captación con un paso igual al diámetro de spot. Derecha, captación con un paso al 20 % del diámetro de spot.	84
6.11.	Captación de las capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 para el sistema de capta- ción con colimador. Izquierda, captación con un paso igual al diámetro de spot. Derecha, captación con un paso al 20 % del diámetro de spot.	85
6.12.	Captación de las capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 para el sistema de captación con lente biconvexa. Izquierda, captación con un paso igual al diámetro de spot. Derecha, captación con un paso al 20 % del diámetro de spot.	85
6.13.	Captación de las capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 para el sistema de captación con lente biconvexa y colimador. Izquierda, captación con un paso igual al diámetro de spot. Derecha, captación con un paso al 20 $\%$ del diámetro de spot.	86
6.14.	Fotografía de la captura de carne picada	87
6.15.	Imagen del tejido (centro) y sus espectros en los puntos señalados alrededor de la muestra. Los espectros han sido corregidos en reflexión y se encuentran en el rango de 450 a 850 nm.	88
6.16.	Espectros de la carne picada, grasa y perejil	88
6.17.	Espectros a una $\lambda$ determinada. Arriba a la izquierda, $\lambda = 542 nm$ y a la derecha, $\lambda = 550 nm$ . Abajo a la izquierda, $\lambda = 630 nm$ y a la derecha, fotografía del trozo de carne picada.	89
6.18.	Diagrama de cromaticidad según CIE 1931.	90
6.19.	Primarios XYZ usando coordenadas cromáticas	91
6.20.	Funciones de igualación según el observador estándar en CIE 1931.	91
6.21.	Esquema gráfico para la obtención de XYZ	92
6.22.	Representación de colores primarios.	92
6.23.	Tetraedro del sistema RGB basado en coordenadas cartesianas (8 bits)	93
6.24.	Izquierda, fotografía de la muestra capturada. Derecha, reconstrucción de color de la muestra con CIE 1931	93

## Índice de tablas

1.1.	Resumen de técnicas espectroscópicas, rango espectral y forma de interactuar con la materia.	4
3.1.	Especificaciones del espectrómetro HR2000CG-UV-NIR.	30
3.2.	Especificaciones del motor VT-80 2SM MLS.	32
3.3.	Características de la fibra P300-1-SR	33
3.4.	Detalles y especificaciones de la lente Biconvexa KBX046 N-BK7	36
3.5.	Especificaciones de la montura LMR 1/M de la lente	36
3.6.	Características del colimador F220SMA-A	38
6.1.	Factor de escala para cada elemento de ntro de un grupo $\ \ldots \ \ldots \ \ldots \ \ldots \ \ldots \ \ldots$	81
6.2.	Longitud de línea, mm (lp/mm), en función del índice de grupo e índice de elemento	83

### Capítulo 1

### Introducción y estructura del proyecto

#### 1.1. Estructura de la memoria

La presente memoria está dividida en siete capítulos organizados según el orden secuencial seguido para el desarrollo de este proyecto.

En este primer capítulo se sitúa la luz en un orden cronológico y se hace hincapié en las aplicaciones médicas sobre tejido biológico y productos alimentarios, que comparten ciertas características, sobre todo en la reflectancia difusa.

En el segundo capítulo se habla de la teoría sobre la interacción de la luz con el tejido, así como sus características más representativas.

En el tercer capítulo se enumera las muestras que se han analizado y las características de los componentes que se han utilizado para los distintos montajes. También se explica como se ha obtenido los espectros paso a paso hasta llegar a un sistema automatizado.

En el cuarto capítulo, se explica como varía la potencia y el diámetro de spot respecto a la distancia con la muestra para los distintos montajes realizados.

En el quinto capítulo, se explica la realización de una interfaz gráfica para la medida y análisis de los espectros obtenidos por medio de la reflectancia difusa.

En el sexto capítulo, se explica las prestaciones de los sistemas de captación estudiados en este trabajo así como el análisis de los espectros capturados por el mejor sistema.

Para finalizar, el séptimo capítulo recoge las conclusiones obtenidas y las líneas futuras de investigación abiertas a raíz de este trabajo.

#### 1.2. Introducción

La luz, ha sido percibida por el ojo humano desde tiempos inmemoriales, tanto es así que en el capítulo I de Génesis de la Biblia, dice: "Dios vio que la luz era buena, y separó la luz de las tinieblas".

Si no fuera por el Sol, fuente de vida para los humanos. Si no fuera por Thomas Edison y su miedo a la oscuridad [1], lo que le impulso a inventar, la bombilla, o por lo menos el primero en patentarla en 1880. Gracias a este invento, la bombilla, paso a ser uno de los inventos más utilizados por el hombre desde su creación hasta la fecha (según una lista de la revista *Life*, es la segunda invención más útil del siglo XIX [2]). Tras la invención, la luz ha llegado a ser omnipresente en nuestras vidas.

Nosotros, los humanos, por medio de la vista, evaluamos los objetos a través de la luz que emiten o reflejan, con la luz estáis leyendo esto, tanto si lo leéis sobre un papel o como en una pantalla de ordenador. Pero, realmente, ¿qué es la luz? ¿cómo se comporta? ¿cómo ha evolucionado con el tiempo? ¿qué ha introducido a la medicina?

Años después del invento de la bombilla, muchos físicos han ido describiendo los fenómenos, propiedades, comportamientos y características de la luz.

A mediados del siglo XX, con los avances científicos y tecnológicos, específicamente en la electrónica y la óptica, surge la fotónica [3], definida como la tecnología donde se genera y se controla la luz, cuya unidad es el fotón.

La luz abarca todo el espectro electromagnético (Fig. 1.1), aunque en óptica se suele trabajar en un rango espectral más acotado, que abarca las radiaciones ultravioleta (100 a 400 nm), visible (400 a 750 nm) e infrarrojo (750 nm a 1000  $\mu m$ ), siendo la longitud de onda, su parámetro más importante por la interacción con la materia, ya que su energía es inversamente proporcional a la longitud de onda. Esto implica que sea determinante en la refracción, en la absorción, en la penetración en tejidos, etc.



FIGURA 1.1: Espectro electromagnético [4].

La interacción de la luz con el material puede producir alteraciones moleculares cambiando por completo las propiedades del material, incluso a longitudes de onda pequeñas. Este fenómeno es conocido como foto(isomerización) y ejemplo típico es el daño producido por la luz UV-B (280 a 315 nm) en la epidermis.

Sin embargo, la interacción con luz visible no es dañina ya que la energía de sus fotones es baja y solo les permite excitar electrones, con una transición de un nivel inferior a otro superior. En el caso de los infrarrojos la energía es menor que en la visible, lo que hace vibrar las moléculas.

Las técnicas espectroscópicas estudian la interacción de la radiación con la materia [5] proporcionando información detallada sobre la su composición y/o estructura, mediante el análisis de su espectro. Dentro de estas técnicas, se encuentran las técnicas ópticas, que presentan una menor penetración (<3 mm) con una gran resolución sin llegar a ser perjudiciales para el organismo.

En los tejidos, el rango de longitudes de onda utilizadas está limitado por la absorción de sus componentes [6]: ADN, aminoácidos (proteínas), melanina, sangre (hemoglobina) y agua. Siendo los más principales cromóforos de la piel: la hemoglobina, la melanina y el agua. La zona en la que estos componentes tienen una absorción menor se le llama *ventana terapéutica o diagnóstica* (Fig. 1.2). Abarca desde los 600 nm hasta los 1400 nm, región de estudio óptima.



FIGURA 1.2: Ventana terapéutica (600-1400 nm) e interacción de las longitudes de onda del espectro electromagnético con los tejidos biológicos [6].

En las técnicas ópticas de tratamiento el rango espectral depende del objetivo y el límite lo marca el riesgo que se quiera tomar. Hay técnicas que destruyen el tejido para eliminar elementos no deseados y otras técnicas que pasan desapercibidas por el organismo, algunas de estas técnicas se aprecian en la tabla 1.1. Además, estas técnicas ópticas abarcan, a grandes rasgos, una doble funcionalidad en medicina, ya que pueden tener como finalidad tanto el tratamiento como el diagnóstico de patologías.

Spectroscopic Techniques for Biological and Biomedical Applications									
	Wavelength*	Energy*							
Spectral Region*	(cm)	$(\text{kcal } mol^{-1})$	Techniques	Properties					
$\gamma - Ray$	$10^{-11}$	$3x10^{8}$	Mössbauer	Nucleus properties					
X - ray	$10^{-8}$	$3x10^{5}$	X-ray diffraction/scattering	Molecular structure					
UV	$10^{-5}$	$3x10^{2}$	UV absortion	Electronic states					
Visible	$6x10^{-11}$	$5x10^{3}$	Visible absortion	Electronic states					
			Luminescence	Electronic states					
Infrared	$10^{-3}$	$3x10^{0}$	IR absortion	Molecular vibrations					
			IR emission	Electronic states					
Microwave	$10^{-1}$	$3x10^{-2}$	Microwave	Rotations of molecules					
	$10^{0}$	$10^{-3}$	Electron paramagnetic resonance	Nuclear spin					
Radio-frecuency	10	$3x10^{-4}$	Nuclear magnetic resonance	Nuclear spin					
*Approvimate values									

\*Approximate values

Tabla	1.1:	Resumen	de técnicas	espectroscópicas,	$\operatorname{rango}$	espectral	y foi	rma d	le ii	nteractua	r con
				la materia	[7].						

En el caso del tratamiento, la óptica puede aportar ventajas en la lucha contra ciertas enfermedades frente a las técnicas convencionales, o bien incluso proporcionar soluciones allá donde no existían. Algunas de las técnicas ópticas de tratamiento son la Terapia Láser de Baja Intensidad (Low Intensity Laser Therapy, LILT), la Termoterapia o la Terapia Fotodinámica (Photodynamic Therapy, PDT). Así mismo el diagnóstico puede beneficiarse de las técnicas ópticas, que aportan una radiación no ionizante y por tanto no peligrosa para el paciente, un carácter poco invasivo y una alta resolución. Algunas de estas técnicas son la Tomografía de Coherencia Óptica (Optical Coherente Tomography, OCT [8]), la espectroscopia de Fluorescencia, la espectroscopia Raman y la espectroscopia de reflectancia difusa [9].

Ninguna de las técnicas ópticas no invasivas es considerada superior, pero si que puede complementar las carencias de otra, por lo que es común combinar las técnicas, por ejemplo sistemas capaces de medir la reflexión difusa y la fluorescencia para incrementar la sensibilidad del diagnóstico.

En el caso de reflectancia difusa también se ha usado con éxito para medir la calidad de productos alimentarios, como frutas [10, 11] o productos cárnicos [12].

En este proyecto se ha elegido de entre los métodos ópticos no invasivos, la espectroscopia de dispersión elástica (*ESS, Elastic Scattering Spectroscopy*) [13, 14], también conocida como espectroscopia de reflectancia difusa (*DRS, Diffuse Reflectance Spectroscopy*)[14–17]. Esta es la técnica es particularmente interesante debido a que el espectro de reflexión obtenido contiene

información sobre los cromóforos de los tejidos así como de su morfología. Las propiedades de absorción y dispersión de los tejidos dependen de su composición bioquímica y estructura celular, y de la longitud de onda. Se ha demostrado que las propiedades ópticas de los tejidos malignos difieren de las de los tejidos sanos y normales [18]. Los métodos ópticos han sido estudiados para diagnosticar patologías como cáncer de vejiga [13], pólipos en el colon [15], cáncer de ovarios [16], pre-cáncer cervical [17], detección de lesiones como angiomas (crecimiento anómalo de las arterias en una zona determinada) [19] y un largo etcétera.

Con esta técnica se trabaja en zonas donde sería más cómodo hacerlo sin contacto ya que podrá haber zonas que sean perjudiciales para el propio organismo, como es el caso de los aneurismas de aorta en los que la pared arterial está debilitada y el contacto podría producir una fisura.

Los estudios con contacto suelen usar fibra óptica o esferas integradoras para captar prácticamente toda la reflexión (Fig. 1.3), pero el resultado de una y de otra son similares. Como fuentes de luz se suele usar lámparas halógenas o láser. En el caso del láser o LEDs permiten analizar una longitud de onda determinada y por tanto sólo un componente en la muestra.



FIGURA 1.3: Espectroscopia con contacto [20].

Así que en este proyecto se utiliza reflectancia difusa con un sistema básico sin contacto, con muestras ex-vivo<sup>1</sup> con una fuente blanca de rango espectral ancho determinada por la ventana terapéutica (Fig. 1.2). Por lo general, estas fuentes suelen ser lámparas halógenas que abarcan el rango visible e infrarrojo.

En cuanto a la captación del espectro, se suele utilizar una fibra (Fig. 1.4), pero en este trabajo se ha sustituido por una fibra de gran diámetro para que tenga un gran cono de captación y así obtener una gran parte de reflexiones producidas. Como dispositivo de medida, un espectrómetro que esta limitado por la absorción del agua (200 a 1400 nm), donde se puede

 $<sup>^1\</sup>mathrm{En}$ este caso, se ha utilizado carne de uso alimentario a modo de prueba de viabilidad

medir los espectros de la sangre y la grasa. Además, el espectro característico de la sangre esta entre 500 y 600 nm. Por tanto, el espectrómetro que utilizamos tiene que contener estos rangos, en nuestro caso tiene un rango de 200-1100 nm que por su sensibilidad se reduce a 450-750 nm.



FIGURA 1.4: Fibra con varios haces [21].

En caso de aumentar el espectro medible, hay que tener en cuenta que la grasa y el agua tienen unos picos de absorción más altos que facilitarían la medida de concentración de agua y grasa [22], pero esto implica cambiar el espectrómetro que cubra ese rango (Fig. 1.5).



FIGURA 1.5: Espectros en absorción de hemoglobina oxigenada  $(HbO_2)$ , desoxigenada (Hb), grasa y agua [22].

El objetivo y motivación en este trabajo es identificar a grandes rasgos la cantidad de sangre o grasa en el tejido para el mejor sistema de los cuatro que se estudiarán. La cantidad de sangre y de grasa son indicadores del estado del tejido. Por un lado, un tejido cancerígeno necesita una mayor cantidad de sangre que lo alimente debido a su crecimiento anómalo (tumor) provocando En cuanto al análisis de las medidas obtenidas, se estudia el espectro en las longitudes de onda donde se conoce la absorción de un componente determinado, comparando las variaciones en ese punto. A veces, elegir un único punto puede hacer que la detección sea poco fiable frente al ruido o pequeñas variaciones, por eso cuanto mayor sea el número de puntos a analizar contra restará los efectos del ruido y las desviaciones en una longitud de onda.

Para la comunicación de cada uno de los componentes así como el análisis de los datos obtenidos de la captura de cada espectro de la muestra, se ha utilizado el programa de Matlab. Este programa no sólo nos ofrece numerosas funciones y/o facilidad en el tratamiento de datos sino que también nos permite controlar dispositivos a través de distintas interfaces. En este proyecto se ha estudiado la dependencia del diámetro del spot con la altura para cada sistema de evaluación de reflectancia difusa y se ha realizado una interfaz gráfica para que cualquier usuario pueda interactuar de manera intuitiva. Por otro lado, también se realizó reconstrucción de imágenes para cada sistema, partiendo de sus espectros y ver la resolución de cada uno.

### Capítulo 2

### Interacción Luz-materia

La espectroscopia óptica engloba todos aquellos métodos analíticos basados en la interacción de la luz y la materia [23], y durante más de doscientos años se ha empleado en múltiples campos debido a su gran especificidad.

Con la luz que se percibe se puede obtener información de color, forma o intensidad. No obstante, la luz percibida y la no percibida, lleva mucha más información de la que se puede analizar a simple vista. Además, hay que tener en cuenta que cuando la luz entra en contacto con cualquier material se verán modificadas varias de sus propiedades como color, ángulo, polarización, intensidad, etc.

Por ejemplo, un tejido negro absorbe más luz que uno blanco, puesto que la cantidad de luz reflejada es menor (Fig 2.1) o una superficie caliente hace que la luz se refracte a a poca distancia de su superficie (espejismo).



FIGURA 2.1: Formación del color (blanco y negro) [24].

Entonces, el poder medir estos datos implicaría conocer mejor las propiedades del material, es por ello que la medida de parámetros ópticos en función de la longitud de onda (espectro) se convierte en la huella dactilar de la materia bajo análisis (firma espectral), de forma que ésta es distinguible de manera inequívoca de todas las demás a partir de sus propiedades espectrales, determinando su composición tanto cualitativamente como cuantitativamente de una muestra. El conocimiento de las propiedades ópticas juega un papel importante en aplicaciones de diagnóstico, terapia y cirugía en biomedicina.

Propagación luz-medio:

- Índice de refracción
- Absorción
- Esparcimiento o *scattering*: Rayleigh, Mie
- Coeficiente de *scattering* reducido
- Anisotropía de *scattering*
- Anisotropía de forma o estructural
- No linealidades: *scattering* inelástico, efecto Kerr óptico

#### 2.1. Tipos de interacción

Cuando un rayo de luz se propaga por un medio y alcanza el límite que lo separa de un segundo medio, puede suceder, que retorne al primero (reflexión), o que lo atraviese y que ingrese al segundo medio donde parte se convertirá en otra forma de energía (absorción) y parte no cambiará (transmisión) [25].

Dos, o los tres de dichos fenómenos ocurren simultáneamente, y como la energía no se puede destruir, la suma de la energía transmitida, absorbida y reflejada debe ser igual a la energía incidente.

Por lo tanto, la aplicación de la luz en la forma más conveniente exige un control y una distribución que se consigue modificando sus características a merced de los fenómenos físicos de reflexión, absorción y transmisión de la luz.

#### 2.1.1. Reflexión

Cuando unas ondas de cualquier tipo inciden sobre una barrera plana como un espejo, se generan nuevas ondas que se mueven alejándose de la barrera. Este fenómeno se denomina reflexión y la relación entre la luz reflejada y la luz incidente se denomina reflectancia de la superficie.

La reflexión de la luz se produce en la interfaz entre materiales y es debida a la diferencia de índices de refracción entre los medios. Viene dada por la siguiente expresión 2.1:

$$I_R = I_o \cdot R \tag{2.1}$$

 ${\rm Donde}$ 

- $I_o$  : intensidad incidente.
- $I_R$  : intensidad reflejada.
- $R = \left(\frac{n1-n2}{n1+n2}\right)^2$  : coeficiente de reflexión.
- n1, n2 : índices de refracción del medio inicial y reflectivo respectivamente.

Los fotones que logren penetrar la materia podrán ser absorbidos o esparcidos, en este último caso los fotones serán desviados de su dirección de propagación inicial en un ángulo  $\Theta$ , el cual está fuertemente relacionado con el factor de anisotropía g [26].

Cualquier superficie que no es completamente absorbente (negra en el caso de luz visible) puede reflejar luz. La cantidad de luz que refleja y la forma en que dicha luz es reflejada se determina por las propiedades de reflexión de la superficie. Se distinguen cuatro tipos de reflexiones, a saber:

- 1. Reflexión especular (Fig. 2.2): Se produce cuando la superficie reflectora es lisa. Dicha reflexión obedece a dos leyes fundamentales:
  - a) El rayo incidente, el rayo reflejado y el normal a la superficie en un punto de incidencia se trazan en un mismo plano.
  - b) El ángulo de incidencia (i) es igual al ángulo de reflexión (r) con respecto a la perpendicular a la superficie.



FIGURA 2.2: Reflexión especular [25].

2. Reflexión compuesta (Fig. 2.3): A diferencia de lo que ocurre en la reflexión especular, no hay imagen de espejo de la fuente de luz, pero el ángulo de intensidad máxima reflejada es igual al ángulo de incidencia. Esta reflexión ocurre cuando la superficie es irregular o rugosa.



FIGURA 2.3: Reflexión compuesta [25].

3. Reflexión difusa (Fig. 2.4): Se produce cuando la luz que incide sobre una superficie es reflejada en todas las direcciones, siendo el rayo normal a la superficie el de mayor intensidad. También se produce cuando la luz entra en el material, interacciona con éste y sale de él.



FIGURA 2.4: Reflexión difusa [25].

4. Reflexión mixta (Fig. 2.5): Es una reflexión intermedia entre la especular y la difusa, en la que parte del haz incidente se refleja y parte se difunde. Este tipo de reflexión la presentan los metales no pulidos, el papel brillante y las superficies barnizadas.



FIGURA 2.5: Reflexión mixta [25].

#### 2.1.2. Transmisión

Al atravesar el material, parte de la luz se pierde debido a la reflexión en la superficie del medio siguiente y parte se absorbe. La relación entre la luz transmitida y la luz incidente se denomina *transmitancia* del material. En la transmisión se pueden diferenciar tres tipos: regular, difusa y mixta.  Transmisión regular (Fig. 2.6): En esta transmisión, el haz que incide sobre un medio, la atraviesa y sale de él como tal haz. Los medios que cumplen esta propiedad, se les denomina cuerpos "transparentes" y permiten ver con nitidez los objetos colocados detrás de ellos.



FIGURA 2.6: Transmisión regular [25].

2. Transmisión difusa (Fig. 2.7): Transmisión en la que el haz incidente se difunde por el medio, saliendo del mismo en múltiples direcciones. A estos medios se les denomina "tras-lúcidos" y los más conocidos son los cristales esmerilados y los vidrios orgánicos opalizados. Los objetos colocados detrás de ellos no son distinguidos con precisión.



FIGURA 2.7: Transmisión difusa [25].

3. Transmisión mixta (Fig. 2.8): Es una forma de transición de la transmisión, intermedia entre la regular y la difusa. Se presenta en vidrios orgánicos y cristales de superficie labrada. Aunque la difusión del haz de luz no es completa, los objetos no se pueden observar claramente detrás del mismo aunque sí su posición.



FIGURA 2.8: Transmisión mixta [25].

#### 2.1.3. Absorción

Se denomina absorción a la transformación de la energía radiante en otra forma de energía, generalmente en forma de calor.

Este fenómeno es una característica de todas las superficies que no son completamente reflectoras, y de los materiales que no son totalmente transparentes. La relación entre la luz absorbida y la luz incidente se denomina *absortancia* del material.

La absorción de ciertas longitudes de onda de luz se denomina absorción selectiva. En general, los objetos de color le deben su color a la absorción selectiva.

Si la energía de un fotón que incide sobre un átomo corresponde a la energía necesaria para llevar a un electrón de dicho átomo a un estado energético superior, es decir, un estado energético superior al estado base, habrá absorción [27, 28]. Cuando el electrón excitado se relaja o "salta" de un nivel energético superior a uno inferior, por ley de conservación de energía, la energía que pierde el electrón al relajarse, se convertirá en calor o en luminiscencia.

La ley que describe cómo los efectos de absorción atenúan la radiación electromagnética, cuando esta pasa a través de un medio, es la ley de Beer-Lambert, la cual se muestra en la ecuación 2.2:

$$I(d) = I_o e^{-\mu_a d} \tag{2.2}$$

Donde

- d es la distancia desde la interfaz y es paralela a la dirección de propagación [m] .
- I(d) es la irradiancia en función de la distancia d $[W/m^2]$  .
- $I_o$  es la irradiancia incidente  $[W/m^2]$
- $\mu_a$  es el coeficiente de absorción del medio por unidad de longitud en  $[m^{-1}]$

El coeficiente de absorción es el inverso de la distancia promedio que un fotón puede recorrer antes de ser absorbido y está expresado por la ecuación 2.3.

$$\mu_a = \rho_a \sigma_a \tag{2.3}$$

Donde

•  $\rho_a$  es el número de partículas absorbentes contenidas en un volumen  $[1/m^3]$ .

•  $\sigma_a$  es la sección eficaz de absorción de una partícula absorbente  $[m^2]$ .

Se asume que las partículas absorbentes con un área eficaz a  $\sigma_a$  son idénticas y que están distribuidas de manera uniforme.

Se puede decir que la absorción es el proceso por el cual, los átomos o moléculas de un material, adquieren o toman energía de una onda electromagnética incidente, provocando que esta última sea atenuada.

#### 2.1.4. Esparcimiento o Scattering

Cuando la frecuencia de la onda electromagnética asociada al fotón que incide sobre una partícula, no coincide con la frecuencia natural de dicha partícula, es decir, no puede llevar a un nivel energético superior a los átomos de esa partícula, habrá esparcimiento o *scattering*.

De manera similar a la atenuación de una onda electromagnética debida a la absorción en un medio, la atenuación debida sólo a los fenómenos de esparcimiento puede ser expresada con la ecuación 2.4.

En esta ecuación se asume que no hay redirección de fotones a su dirección de propagación inicial después de ser desviados por un evento de esparcimiento.

$$I(d) = I_o e^{-\mu_s d} \tag{2.4}$$

Donde

- d es la distancia des de la interfaz y es paralela a la dirección de propagación  $[\mathbf{m}]$  .
- I(d) es la irradiancia en función de la distancia d $[W/m^2]$ .
- $I_o$  es la irradiancia incidente  $[W/m^2]$
- $\mu_s$  es el coeficiente de esparcimiento del medio por unidad de longitud en  $[m^{-1}]$

El coeficiente de esparcimiento es el inverso de la distancia promedio que un fotón puede recorrer antes de enfrentarse a un evento de esparcimiento y está expresado por la ecuación 2.5.

$$\mu_s = \rho_s \sigma_s \tag{2.5}$$

 ${\rm Donde}$ 

•  $\rho_s$  es el número de partículas esparcidoras contenidas en un volumen  $[1/m^3]$ .

•  $\sigma_a$  es la sección eficaz de esparcimiento de una partícula esparcidora  $[m^2]$ .

Resulta más intuitiva la longitud de *scattering* o lo que es lo mismo, el camino medio libre de *scattering*  $l_s = \frac{1}{\mu_s} [m]$ , que indica la distancia media que recorrerá la luz en el medio entre dos esparcimientos sucesivos, *mean free-path*.

Se asume que las partículas esparcidoras con un área eficaz  $\sigma_a$  son idénticas y que están distribuidas de manera uniforme. Como se asumió que el tejido biológico es un medio turbio, donde los fenómenos de absorción y de esparcimiento se presentan simultáneamente, la distancia promedio que un fotón podrá recorrer en el tejido antes de ser esparcido o absorbido, es decir, el camino medio libre total se define como la profundidad de penetración y es el inverso del coeficiente de atenuación o extinción total  $\mu_t$ , ambos se expresan como:

$$\delta = \frac{1}{\mu_s + \mu_a} = \frac{1}{\mu_t} \ [m] \tag{2.6}$$

El esparcimiento se clasifica en dos tipos:

- Elástico: Se da cuando la energía del fotón incidente es la misma que la del fotón esparcido, cambiando únicamente la dirección de propagación.
- Inelástico: En el esparcimiento inelástico la dirección de propagación del fotón esparcido también cambia y se da cuando el fotón incidente cede o gana energía al interactuar con un átomo. Cuando el fotón cede parte de su energía se le conoce como esparcimiento Raman-Stokes, cuando el fotón gana energía se le conoce como esparcimiento Raman-anti Stokes. Otro tipo de esparcimiento es el de Brillouin.

Para describir el esparcimiento elástico se utilizan diversos modelos, dependiendo de las dimensiones de las partículas esparcidoras y de la longitud de onda de la onda electromagnética incidente. Los modelos más conocidos son:

- Esparcimiento de Mie.
- Esparcimiento de Rayleigh.

El esparcimiento de Rayleigh se da cuando la longitud de onda de la luz incidente es mucho mayor que el tamaño de la partícula esparcidora. Este esparcimiento produce que la intensidad esparcida sea proporcional a  $\lambda^{-4}$ , por lo que tiene una fuerte dependencia de la longitud de onda. Este esparcimiento es isotrópico pues la intensidad esparcida tiene una distribución simétrica respecto al ángulo de esparcimiento, por ejemplo, la intensidad que es esparcida con un ángulo de 0° grados respecto de la dirección de propagación es igual a la intensidad esparcida con un ángulo de 180°. Cuando la longitud de onda, es aproximadamente del tamaño de la partícula esparcidora, se utiliza el modelo de Mie para describir el esparcimiento. El esparcimiento de Mie no es isotrópico a diferencia del esparcimiento de Rayleigh, pues tiende a ser hacia adelante. El esparcimiento de Mie depende poco de la longitud de onda, pues la intensidad de la onda esparcida es proporcional a  $\frac{1}{\lambda^x}$  donde  $0.4 \le x \le 0.5$ , siempre y cuando las partículas sean esféricas o de una geometría similar.

Para poder describir cuantitativamente qué tan isotrópico o anisotrópico es el esparcimiento en la materia, se utiliza el factor de anisotropía g, y se puede interpretar como la media del coseno del ángulo de esparcimiento (2.10) y por tanto indica la dirección de la luz esparcida. En otras palabras, mide la tendencia del evento a producir *scattering* hacia adelante o hacia atrás.

Cuando g=0 se tiene un esparcimiento isotrópico (*scattering* de Raileigh), cuando g=1 el esparcimiento tiende hacia adelante y es anisotrópico (régimen Mie) y cuando g=-1 se tiene retro-esparcimiento, es anisotrópico y la luz esparcida se dirige hacia atrás, hacia la fuente.

El parámetro g esta relacionado con la función de fase de *scattering* (SPF)(Fig. 2.9).



FIGURA 2.9: Antrisopía de *scattering* (g) relacionado con la función de fase de *scattering* (SPF) [29].

Al considerar g en los eventos de esparcimiento, surge el coeficiente reducido de esparcimiento, el cual se define en la ecuación 2.7. Donde  $\mu'_s$  es el inverso de la distancia promedio que un fotón podrá recorrer antes de ser esparcido pero tomando en cuenta el factor de anisotropía g.

$$\mu'_{s} = \mu_{s}(1-g) \tag{2.7}$$

En definitiva, el esparcimiento es caracterizado mediante el coeficiente de *scattering* y el factor de anisotropía de *scattering* g.



FIGURA 2.10: Ángulo de scattering [29].

### 2.2. Interacción luz-tejido biológico

Los tejidos biológicos se caracterizan por presentar un alto grado de inhomogeneidad que es una consecuencia de la estructura celular, pues ésta contiene orgánulos (mitocondrias y núcleo) de diversos tamaños y composiciones. Por lo tanto, la materia básica (constituyentes del tejido intracelular y extracelular) tiene un índice de refracción diferente a cada uno de los índices de refracción de los orgánulos [30].

El esparcimiento es un proceso físico en el que alguna forma de radiación es forzada a desviarse de su trayectoria rectilínea por una o más no uniformidades localizadas en el medio donde se propaga la radiación. De acuerdo con esta definición, la estructura de las células y las dimensiones de los orgánulos son los responsables, en gran medida, del proceso de esparcimiento de luz por los tejidos biológicos.



FIGURA 2.11: Esquema de reflexión difusa, transmisión y absorción de la luz [31].

Las reflexiones que no sufren esparcimiento son llamadas reflexiones especulares y las que si sufren esparcimiento son reflexiones difusas y contienen gran información acerca del tejido. En la figura 2.11, se puede observar la reflexión difusa de la luz que incide en una muestra de tejido, cuyo grosor es t, donde también ocurre el fenómeno transmisión y absorción de la luz.

La absorción en los tejidos es función de la composición molecular del tejido. Las moléculas absorben fotones, cuando la energía de los mismos iguala a la de un intervalo entre estados energéticos internos. En el extremo espectral de menor longitud de onda estas transiciones son electrónicas. La absorción es útil en aplicaciones médicas, tanto para procesos de diagnóstico como para procesos terapéuticos. En el caso del diagnóstico, el espectro de absorción de una molécula puede servir como identificador de ésta, pues las transiciones entre los niveles de energía, se darán a longitudes de onda específicas. Para el caso del tratamiento, donde se utiliza la luz para producir cambios estructurales en el tejido, como la terapia fotodinámica o la cirugía láser, la absorción es importante y necesaria, ya que sólo la luz absorbida puede producir cambios físicos, químicos o fisiológicos en un sistema biológico [32].

A continuación se explica la absorción de los componentes del tejido [9]

- ADN: Tiene un pico de absorción a 258 nm, pero su absorción cae 4 órdenes de magnitud al aumentar la longitud de onda a 300 nm, y no tiene actividad relevante en el VIS-NIR.
- Aminoácidos y proteínas: Son fuertes absorbentes para longitudes de onda menores a 300 nm y tienen picos locales entre 260 a 280 nm.
- Melanina: Son grupos de polímeros que dan pigmentación y son los cromóforos dominantes en la piel. En la mayoría de la gente la absorción de la epidermis es normalmente dominada por la absorción de la melanina. En el rango visible (400 a 700 nm), la melanina muestra fuerte absorción, que decrece a longitudes de onda más largas.



FIGURA 2.12: Espectro de absorción de la melanina [9].

• Piel: La capa exterior es la epidermis. Debajo está la dermis, que está hecha de complementos de la piel como los folículos capilares y las glándulas dulces, rodeadas por tejido de fibras de soporte y colágeno. Finalmente la capa más interna, llamada tejido subcutáneo, contiene células productoras de grasa y tejido fibroso. La parte más externa de la epidermis es la capa córnea, formada por millones de células muertas, sustituidas continuamente por células vivas originadas en la capa basal. Los melanocitos, que están entre las células basales de la epidermis, producen melanina, el pigmento protector responsable del color de la piel. Los melanocitos son estimulados por la luz del sol y producen melanina para proteger la piel contra la radiación UV dañina.



FIGURA 2.13: Izquierda, estructura de la piel. Derecha, espectro de absorción de la grasa [9].

 Sangre y hemoglobina: La hemoglobina tiene varias bandas de absorción. Las moléculas de hemoglobina dentro de las células rojas de sangre (eritrocitos) portan el 97% del oxígeno en sangre mientras que el 3% restante está disuelto en el plasma.

La hemoglobina en el estado oxigenado es conocida como oxihemoglobina  $(HbO_2)$ ; en el estado reducido, se llama deoxihemoglobina (Hb). Si la molécula de hemoglobina se une a monóxido de carbono, se convierte en carboxihemoglobina (HbCO).

La hemoglobina oxigenada es un absorbente fuerte por encima de 600 nm; después cae muy profundamente, casi en dos órdenes de magnitud, y permanece baja. La absorción de la hemoglobina desoxigenada, sin embargo, no cae drásticamente; permanece relativamente alta, aunque decrece con longitudes de onda crecientes. El punto donde los dos espectros interceptan se da a los 800 nm.

Se conoce que la absorción de la sangre sigue el comportamiento en absorción de la hemoglobina y el agua. Aunque la desoxihemoglobina y la melanina absorben fuertemente en la ventana de diagnóstico, sus relativamente bajas concentraciones en los tejidos explican porqué no afectan significativamente al proceso de transmisión.



FIGURA 2.14: Espectro de absorción la hemoglobina. Rosa, espectro de la deoxihemoglobina (Hb) y azul, el espectro de la oxihemoglobina  $(HbO_2)$  [9].

Agua: En el extremo NIR de la ventana, el absorbente dominante es el agua debido a las transiciones entre sus estados de energía vibracionales. En el rango de absorción de 700 a 1100 nm se observa que incluso en la ventana de transmisión del agua (930 nm), donde la absorción del agua es bastante baja, el agua todavía contribuye significativamente a la atenuación total del tejido dado que su concentración es muy alta en el tejido biológico.



FIGURA 2.15: Espectro de absorción del agua [9].

La región espectral donde las componentes del tejido disminuyen se llama ventana terapéutica (Fig. 2.16) y esta comprendida entre 600 nm y 1400 nm, ya que fuera de este rango la radiación se ve fuertemente absorbida.

De todos los componentes del tejido vivo, el principal absorbente es el agua y luego la sangre. Siendo la sangre la dominante en la ventana terapéutica y por tanto, es la que la limita a (600 a 1400 nm). La concentración de sangre es un indicador importante del estado de los tejidos, sin embargo, debido a su alta absorción impide ver el espectro del resto de los componentes. Este es, de hecho, el principal impedimento que se encuentran las técnicas ópticas en el análisis de tejidos vivos.



FIGURA 2.16: Coeficiente de absorción de distintos tejidos biológicos. Se indica la 'ventana terapéutica' (*Diagnostic window*) [33].

En medios celulares, las partículas esparcidoras más importantes son los orgánulos subcelulares. El rango de tamaño de estos orgánulos incluye las longitudes de onda de la ventana terapéutica, al ir sus dimensiones de menos de 100 nm a 6  $\mu m$ . Como esparcidores, la mayoría de estas estructuras caen en el régimen Mie, mostrando patrones de esparcimiento altamente anisótropo dirigido hacia adelante.

La mitocondria, el lugar en que la célula respira y produce energía, es el esparcidor dominante entre los orgánulos. Estas estructuras son aproximadamente cilíndricas con dimensiones características de 0.5 a 2  $\mu m$  El mayor de los orgánulos celulares es el núcleo celular, con un diámetro entre 4 y 6  $\mu m$ . El retículo endoplasmático y el aparato de Golgi son otros de los más grandes. Estos dos orgánulos también tienen pequeñas vesículas que transportan sus variados productos moleculares a través de la célula. Estos pequeños orgánulos de tipo vesícula incluyen lisosomas y perioxisomas de diámetro de 0.25 a 0.5  $\mu m$ .

Las células varían de tamaño y forma en los diferentes tipos de tejido con dimensiones de unas pocas micras o mayores. Una célula aislada puede ser una fuerte esparcidora, pero en el tejido es mayormente de origen subcelular. En la piel, los melanosomas son estructuras de esparcimiento importante variando su tamaño de 100 nm a 2  $\mu m$ .

En la sangre, las células rojas con forma de disco (eritrocitos) son las partículas de esparcimiento más fuertes. El disco eritrocítico es de unos 2  $\mu m$  de grosor con un diámetro de 7 a 9  $\mu m$ . Las propiedades de esparcimiento de la sangre dependen del hematocrito (fracción de volumen de células rojas) y su grado de aglomeración. Las propiedades de esparcimiento de estos tejidos vienen de las in-homogeneidades de pequeña escala y las variaciones a gran escala en las estructuras que forman.

En la siguiente figura 2.17, se muestra la diferencia en el coeficiente de *scattering* cuando el tamaño de una partícula se clasifica en una u otra región. Para partículas pequeñas (en relación con la longitud de onda utilizada), se cumple la relación de Rayleigh, que tiene un factor  $\frac{1}{\lambda^4}$  (dispersa más las longitudes de onda cortas). Cuando las partículas tienen un tamaño similar a la longitud de onda (región de Mie), ya no hay tal relación y prima más el tamaño de la partícula (la pendiente de la curva va disminuyendo a medida que aumenta el tamaño de la partícula).



FIGURA 2.17: Coeficiente de esparcimiento, *scattering*, en función del tamaño de las partículas del medio [29].

Puesto que el *scattering* depende fuertemente del tamaño, forma y estructura de los componentes del tejido, resulta útil para hacer valoraciones en este sentido. Midiendo el esparcimiento, se pueden detectar variaciones en la forma o tamaño de las componentes del tejido, que pueden indicar posibles anomalías. En el tejido, g puede tener valores de entre 0.8 a 0.99 [26]. Por ejemplo, las fibras de colágeno tienen una estructura de bandas que produce esparcimiento Rayleigh y tiene una periodicidad de 70 nm, del orden de 10 veces menor que las longitudes de onda de la ventana de diagnóstico (Fig. 2.18).

La propagación de los fotones en un medio turbio es difícil de conocer puesto que, aun basándose en parámetros sencillos, la composición exacta del medio es desconocida. Por este motivo se utiliza comúnmente el método de Monte Carlo, basado en la aplicación de numerosas simulaciones a partir de los parámetros ópticos, obteniendo modelados fidedignos.

En éste método, las normas locales de transporte de fotones se expresan como distribuciones de probabilidad que describen la distancia de propagación de los fotones entre los sitios de interacción con los tejidos y los ángulos de desviación en la trayectoria del fotón, cuando se produce esparcimiento [31]. Como el método es de naturaleza estadística, al lanzar un mayor


FIGURA 2.18: A) Célula y orgánulos. (B) *Scattering* de Rayleigh producido por los orgánulos. El ángulo indica la desviación de la luz incidente [29].

número de fotones, la simulación será más precisa, sin embargo, esto requerirá que el tiempo para concluir la simulación se incremente [34].

En definitiva, el método Monte Carlo es un método numérico que permite resolver problemas físicos y matemáticos mediante la simulación de variables aleatorias, como es el caso de la distribución de las partículas en un tejido biológico, por tanto, requieren del conocimiento previo de la composición del tejido con gran exactitud.

## 2.3. Reflectancia difusa en los tejidos biológicos

La reflectancia difusa es el fenómeno de interacción luz-materia más apropiado para la caracterización de los materiales. La reflectancia difusa se produce cuando la radiación incidente penetra en la muestra de material y viaja a través de la misma siendo parcialmente absorbida y dispersada. De este modo el espectro de la radiación reflejada en direcciones arbitrarias lleva codificada la composición química de la muestra.

En este caso, la radiación reflejada sale del tejido y por tanto, puede ser medida y analizada. Sin embargo, esta radiación reflejada no sería útil para formar una imagen.

Cuando la radiación penetra el tejido, los fotones son esparcidos y/o absorbidos, y a mayor penetración mayor es la probabilidad de ser absorbido. Por tanto, es más difícil que consiga rebotar con dirección a la superficie y no ser asimilado por el medio que lo rodea. Las inversas de los coeficientes de *scattering* y absorción, denominadas respectivamente longitudes de *scattering* y absorción  $l_s = \frac{1}{\mu_s}$  y  $l_a = \frac{1}{\mu_a}$ , representan la distancia media entre dos eventos de *scattering* o de absorción. La caracterización por reflectancia difusa tiene como objetivo medir estos dos

parámetros y, a través de ellos, identificar la composición del tejido, la concentración de sus componentes y su tamaño, teniendo en cuenta que el espectro estará limitado por la ventana terapéutica. Para ello, se trabaja con fuentes de luz halógena o fuentes de luz blanca de un amplio espectro, abarcando el rango espectral desde el visible hasta los infrarrojos, siendo ideal para el estudio del tejido biológico. El inconveniente de las fuentes halógenas son su elevada temperatura lo que hace inviable trabajar con tejidos vivos que se degraden con la temperatura, como suele ocurrir con los tejidos vivos y en general, orgánicos. Este tipo se fuentes son sustituidas por diodos LED de alto brillo pero con una región espectral más limitada.

La reflectancia difusa tiene como objetivo la medida de la luz retroesparcida por el material. Es vital para estas medidas evitar las reflexiones directas producidas en la superficie de la muestra puesto que tienen una alta potencia y no interaccionan con el tejido, es decir, no aportan información sobre el mismo. Los montajes típicos utilizan una fibra en transmisión y otra en recepción (o varias) de un diámetro de núcleo de unas 200 micras. Estas fibras están en contacto directo con la muestra, de forma que la luz recibida es necesariamente proveniente del tejido. En función de la distancia entre fibras se puede medir la propagación a distintas profundidades y en medios multicapa se podría llegar a medir el grosor de estas [35].



FIGURA 2.19: Esquema básico de un montaje para la medida de reflexión difusa [31].

Se ilumina y se capta la luz ya sea con las fibras ópticas al aire o con un sistema focalizador formado por lentes o esferas. En este caso hay que orientar la parte de transmisión y de recepción de forma que no haya reflexión especular, esto es, formando un ángulo distinto con la superficie. Las fibras a utilizar deben ser de un diámetro mayor que en el caso en el que hay contacto con la muestra puesto que están a una distancia mayor de la muestra y la potencia captada será menor, de acuerdo con la apertura numérica de la fibra. La luz retro esparcida por un medio turbio, como son este tipo de tejidos, pierde las características de onda que tenía al salir de la fuente como son fase y coherencia (cada fotón captado tendrá una fase distinta y aleatoria). A la salida del medio, solo es posible medir la intensidad, caracterizada por el coeficiente de atenuación del material ( $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ ).

$$R(d) = I_o(1 - R^2)e^{\mu_t d}$$
(2.8)

Siendo R(d) la reflectancia medida a tras haber recorrido la luz una distancia d. Con esta técnica sólo se puede obtener la atenuación, no se pueden obtener por separado el coeficiente de absorción y el de *scattering*, ni el factor de anisotropía (puesto que no se mide al ángulo de la luz reflejada). Para medir esos parámetros se utilizan sistemas con esferas integradoras para captar toda la luz esparcida y ecuaciones semi-empíricas contrastadas por simulaciones de Monte Carlo [36].

Al corregir la señal en reflexión para eliminar la dependencia espectral de la fuente se divide la señal capturada entre  $I_o$ , por tanto se tiene

$$\frac{R(d)}{I_o} = (1 - R^2)e^{-\mu_t d}$$
(2.9)

Para obtener el coeficiente de atenuación del medio, se aplica el logaritmo a la expresión anterior:

Por lo tanto, si se mantienen las muestras a una distancia constante de la fuente y la fibra receptora, lo único que cambia es el espectro medido en reflectancia, pudiendo ver así las variaciones entre materiales o zonas de estos.

Los datos que se obtienen, como se ha mencionado, sólo indican el coeficiente de atenuación. La obtención del resto de coeficientes es más costosa y sería necesaria para caracterizar el tejido, pero eso no es lo que se busca en este trabajo. Lo que se pretende obtener, es un método sencillo para distinguir regiones dentro de una muestra, en base a diferencias en las concentraciones de los componentes. Con el coeficiente de atenuación se pueden medir esas diferencias y por tanto diferenciar zonas.

Si a la señal medida R(d) no se le aplica el logaritmo, se trabaja entonces con la señal de reflexión y no con el coeficiente de atenuación. Aun así, la respuesta sigue conteniendo gran parte de la información. Se ha comprobado que, en efecto, el espectro en reflexión normalizado se aproxima mucho a la atenuación, pero los mejores resultados se obtienen siguiendo la ley de Beer-Lambert, es decir, trabajando con -log(R) en lugar de R.

## Capítulo 3

# Materiales y Metodología

Este trabajo se centra sobretodo en la espectroscopia de reflectancia difusa (Apdo. 2.3) y análisis de los datos obtenidos. Cada una de las medidas se han realizado en el rango de la luz visible, con una fuente de luz halógena y un espectrómetro que abarca dicho rango espectral. Todo el proceso captura, desde inicializar el puerto serie hasta el análisis de la captura, se ha hecho con Matlab por la facilidad de sincronización con los los controladores de los motores y el espectrómetro, y la rapidez de cómputo para el procesar los datos capturados.

Para las medidas se fijo un sistema con una fuente de luz, una fibra receptora y dos motores con posicionamiento XY. Partiendo de este sistema se introdujeron distintas configuraciones en la captación de la luz, sustituyendo la fibra por un colimador, una lente biconvexa-fibra, una lente biconvexa-colimador, y luego se fue variando la altura entre el sistema y la muestra.

Finalmente, con la ayuda de Matlab se sincroniza la captura con el posicionamiento de los motores.

## 3.1. Materiales

En este apartado se explica el porqué de la elección de las muestras y también se explica cada uno de los componentes ópticos y como se ha utilizado en este proyecto.

## 3.1.1. Muestras

## 3.1.1.1. Tejidos Biológicos

Para las medidas de reflectancia difusa se utilizado un tejido biológico a modo de prueba de aplicación y validación del sistema y la metodología.



• Carne picada o molida: Está formada por una masa heterogénea de grasa y carne.

FIGURA 3.1: Muestra de la carne picada.

Con esta muestra se pretende comprobar si se detectan diferencias entre sus partes a través de un algoritmo para el mejor sistema de captación que se estudie.

## 3.1.2. Banco de medida

Se enumera y se describe todos los componentes utilizados en los distintos montajes.

- 1. Espectrómetro
- 2. Motores y controladora.
- 3. Fuente de Luz.
- 4. Fibra óptica.
- 5. Colimador
- 6. Lente
- 7. Material de referencia

## 3.1.2.1. Espectrómetro

Un espectrómetro (también llamado espectroscopio o espectrógrafo) es un instrumento óptico que se usa para medir las propiedades de la luz sobre una porción específica del espectro electromagnético. Se utiliza para realizar análisis espectroscópicos e identificar materiales, en nuestro caso tejido biológico. La variable medida es generalmente la intensidad de la luz y la variable independiente es, por lo general, la longitud de onda de la luz [37]. Son instrumentos que funcionan en una amplia variedad de longitudes de onda, desde rayos gamma y rayos X hasta el infrarrojo lejano, y como en nuestro caso la región de interés está restringida a un rango cercano al espectro visible, el estudio se llama espectrofotometría.

El espectrómetro utilizado es el HR2000CG-UV-NIR 3.1 de Ocean Optics [38].



FIGURA 3.2: Espectrómetro HR2000CG-UV-NIR (imagen del fabricante).



A continuación se describe el funcionamiento interno de este espectrómetro detalladamente.

FIGURA 3.3: Esquema del espectrómetro utilizado.

El conector SMA 905 (1) de tipo rosca asegura la fibra óptica al espectrómetro y deja pasar la luz por medio del *slit* (2), un cristal con una abertura de 5  $\mu m$  que regula la cantidad de luz que entra en el banco óptico y controla resolución espectral. Una vez dentro del dispositivo, la luz pasa por el filtro OFLV (3) para posteriormente colimar la luz por medio de un espejo colimador (4), el cual redirigirá el haz (ya colimado) hacia una rejilla de difracción (5), la cual separará al haz de luz incidente en las diferentes longitudes de onda que lo componen para luego ser dirigidas al espejo de enfoque (6), este espejo enfoca la luz sobre el detector CCD (8) que convierte la señal óptica en una señal digital. Cada píxel del detector CCD (2048 píxeles)

Hay que tener en cuenta que el espejo colimador tiene el tamaño exacto para una fibra de entrada de apertura numérica 0.22 (ángulo de aceptancia de 12.7°), lo que implica que no toda fibra es la adecuada y que la rejilla de difracción es un cristal que tiene en su superficie hendiduras a modo de prismas sucesivos, cuya densidad determina la resolución espectral de la rejilla y del espectrómetro.

corresponde a la longitud de onda de la luz que incide sobre ella (cada píxel es un dispositivo

semiconductor fotosensible) y luego transmite la señal digital a la Aplicación OOIBase32.

Ahora describiremos los componentes del espectrómetro. El HR2000CG-UV-NIR está preconfigurado con una rejilla HC-1, específicamente diseñado para proporcionar una gama de longitudes de onda 200-1100nm y una resolución óptica de 1,0nm (FWHM). Este espectrómetro utiliza un sensor CCD de silicio, *Sony ILX511B* [39], que detecta 2.048 elementos para una excelente resolución. El filtro de orden de clasificación OFLV, se aplica directamente a la ventana del detector del espectrómetro (200-1100 nm) para eliminar los efectos de segundo y tercer orden.

El HR2000CG-UV-NIR es un dispositivo *plug-and-play* que se conecta a un ordenador mediante un puerto USB o RS-232. Cuando se conecta al ordenador a través del puerto USB, el HR2000CG-UV-NIR no requiere una fuente de alimentación externa.

La sensibilidad espectral del sensor (Fig. 3.4) limita el uso real del espectrómetro para esta aplicación, al rango 450-750 nm para no superar los 3 dB de caída de potencia [39].



FIGURA 3.4: Sensibilidad espectral del sensor CCD del espectrómetro [39].

En cuanto al eje de intensidad, tiene un rango de hasta 16.000 cuentas y un tiempo de integración desde 3 milisegundos hasta 65 segundos. El número de cuentas guarda relación con la intensidad, tomando 75 fotones/cuenta a 400 nm y 41 fotones/cuenta a 600 nm aproximadamente [40].

El espectrómetro funciona con el software *SpectraSuite*. Este software permite ajustar todos los parámetros de la captura, hacer correcciones en *transmitancia* y *absorbancia*, hacer capturas simultaneas y alguna otra utilidad adicional. El inconveniente de este software es la sincronización con Matlab y por eso ha sido necesario crear un programa propio. Este programa se ha hecho con lenguaje C++ utilizando librerías de *Ocean Optics* y que permita comunicarse con el dispositivo a través de la API *Application Programing Interface* de este. Con este código se obtiene un *ejecutable.exe* que puede ser llamado desde Matlab y recibir parámetros de entrada, en este caso el tiempo de integración en micro-segundos y el nombre de archivo de salida.

La fibra óptica a la entrada del espectrómetro debe ser la proporcionada por el fabricante o en su defecto otra fibra con apertura numérica de 0.22 según las especificaciones del espectrómetro (Tabla 3.1).

$148,6mm \ge 104,8mm \ge 45,1mm$
$570\mathrm{g}$
95mA @ 5VDC
Sony ILX511
2048 - elemento de la matriz CCD de silicio lineal
200 - 1100 nm
$14\mu m \ge 200\mu m$
HC- 1 , 300 líneas por $nm$ rejilla
$5\mu m$ de hendidura
OFLV-200-100 instalado
f/4, 101mm
1,0nm FWHM
<0,05%a $600nm;<0,10%$ a $435nm$
$2x10^8$ (sistema); 2000 : 1 (exploración individual)
SMA 905 - fibra óptica $(AN = 0, 22)$
exploraciones completas en la memoria
cada $13ms$ con el puerto USB
cada $300ms$ con el puerto serie
de $3ms$ a $65sg$
Windows $98/{\rm Me}/2000/{\rm XP}$ , Linux y Mac OS X al utilizar
el interfaz USB de PC's de escritorio o portátiles.
Cualquier sistema operativo Windows de 32 bits al
utilizar el puerto serie en PC's de escritorio o portátiles.

HR2000CG UV-NIR

TABLA 3.1: Especificaciones del espectrómetro HR2000CG-UV-NIR [38].

#### 3.1.2.2. Motores y controladora

Para obtener el espectro de la muestra necesitamos desplazar la muestra y para ello se ha utilizado dos motores y dos controladores del fabricante PI micos. El controlador es *SMC Pollux* (Fig. 3.5) y los motores son *VT-80 2SM MLS* (Fig. 3.6).

Pollux se comunica con el ordenador a través del puerto serie RS-232 y puede funcionar con un solo controlador o un máximo de 16 controladores. Si varios controladores Pollux están trabajando en la misma línea RS-232 a través de la conexión en serie, cada controlador tiene que estar previsto de un número de indice individual, una dirección única con el fin de comunicarse con el *host*.

Pollux usa comandos Venus-2 que consisten en signos ASCII que son interpretados por el controlador y ejecutados inmediatamente. Los comandos pueden ser producidos por cualquier host y cualquier lenguaje de programación, con la condición que haya un acceso a la interfaz RS-232. La forma más sencilla de transmitir directamente al controlador es a través de un terminal ASCII. En este proyecto como ya se ha mencionado anteriormente hemos usado la programación en Matlab, controlado estos motores mediante los controladores Pollux.



FIGURA 3.5: Controladora SMC Pollux (imagen del fabricante) [41].

Los motores debido a sus dimensiones compactas son adecuados para aplicaciones de ciclos de trabajo bajos en instrumentación. Están equipados con finales de carrera integrados y están motorizados con dos fases para el paso del motor, sus movimientos son silenciosos y suaves, a pesar de soportar una carga máxima de 5 kg. Estos dos motores se han montado en este proyecto como XY, para un mejor barrido a la hora de capturar.



FIGURA 3.6: Motor VT-80 2SM MLS (imagen del fabricante) [42].

Datos Técnicos del Motor VT-80	
Rango	50mm
Peso	650 gramos
Capacidad de carga	5kg
Motor (pitch 1 mm)	2 Fases-041
Velocidad máxima	20mm/s
${ m Resolución}/fullstep$	$5\mu m$
Resolución típica	$0,2\mu m$
Bi-direccional Repetibilidad:	$\pm 10 \mu m$
Uni-direccional Repetibilidad:	$0,4\mu m$
corriente nominal:	1,7 <i>A</i>
rango de velocidad:	0,001,20mm/s
Material:	Aluminio anodizado negro

TABLA 3.2: Especificaciones de motor VT-80 2SM MLS [42].

## 3.1.2.3. Fuentes de Luz

Se han utilizado tres fuentes de luz, todas ellas halógenas (lámparas con filamento de tungsteno y un gas del grupo químico de los halógenos) por lo que el rango espectral va desde el visible hasta el infrarrojo cercano (>750 nm). Con éste tipo de fuentes hay que tener en cuenta que conllevan un tiempo de calentamiento para la estabilización del nivel espectral que suele ser de unos 20 a 30 minutos. Hay que esperar ese tiempo desde que se enciende hasta que se toman las medidas para que no haya fluctuaciones entre las medidas.

 La fuente de luz con dos focos halógenos de gran potencia (500 W) se utilizó para medir el área de captación de los sistemas ópticos ya que ilumina una gran área de forma uniforme. Sin embargo, al tener una alta potencia, desprende mucho calor siendo inadecuado para iluminar tejidos biológicos. Para estos últimos, se utiliza la fuente de línea.



FIGURA 3.7: Fuente hálogena.

2. La fuente utilizada para medir la reflectancia de los tejidos es una la fuente PL-950 del fabricante *Fiber Lite* [43] que utiliza una lámpara halógena de cuarzo. Lleva acoplada una fibra con un cabezal que distribuye la luz en forma de línea. Como su nombre indica, sirve para iluminar una franja de la muestra de forma uniforme y es muy útil para orientar la fibra receptora controlando el ángulo de iluminación.



FIGURA 3.8: Fotografía de la fuente con el elemento que produce iluminación en una línea.

## 3.1.2.4. Fibra óptica

La fibra utilizada para capturar el espectro es una fibra P300-1-SR de 300  $\mu m$  de diámetro de núcleo del tipo UV/SR-VIS de *Ocean Optics* con conectores tipo SMA-905 estándar [44].

Algunas de sus especificaciones se muestran en la tabla 3.3.

P300-1-SR							
Rango	Diámetro del núcleo	Revestimiento	Longitud	Apertura Numérica	$\Theta_{max}$	LTBR*	STBR**
200 - 1100 nm	$300 \mu m \pm 6 \mu m$	Poliamida	1m	0,22	$12,7^{\circ}$	12cm	6cm
LTBR* (Long Term Bend Radius): Radio de curvatura permitido a lo largo del tiempo antes de dañar la fibra							
STBR** (Short Term Bend Radius): Radio de curvatura permitido momentáneamente antes de dañar la fibra							

TABLA 3.3: Características de la fibra P300-1-SR [45].



FIGURA 3.9: Atenuación de la fibra óptica P300-1-SR [45].

Las fibras ópticas están diseñados para transmitir la luz desde un extremo de la fibra a la otra con una mínima pérdida de energía.

Las opciones SR- Resistencia a la solarización: La radiación ultravioleta <300 nm degrada la transmisión en las fibras de gel de sílice estándar, lo que resulta en la solarización (aumento de la absorción de la luz en la fibra de UV que pueden invalidar los datos), por eso para aplicaciones por debajo de 300 nm, se recomienda fibras ópticas con resistencia a la solarización [44].

Actúan como fibras de iluminación y lectura, y se conectan fácilmente a los espectrómetros *Ocean Optics*, fuentes de luz y accesorios de muestre.



FIGURA 3.10: Fibra óptica P300-1-SR (imagen del fabricante) [46][45].

Están diseñadas para trabajar en la región visible y tiene una alta atenuación para lambdas menores de 350 nm y superiores a los 850 nm. En el primer montaje, se captura luz con la fibra desnuda, luego hemos modificado el montaje, por ejemplo con una lente biconvexa para obtener una mayor focalización, o con un colimador para tener una focalización constante independiente de la altura entre otros, más adelante detallaremos los distintos montajes realizados en este proyecto. Esta fibra tiene una apertura numérica de 0.22 ( $\Theta_{max} = \pm 12,7^{\circ}$ ) ideal para que el espectrómetro mida correctamente (Apdo. 3.1.2.1).

La apertura numérica denota el ángulo máximo de incidencia o lo que es lo mismo, el ángulo de aceptancia máximo del núcleo  $\Theta_{max}$  y éste guarda relación con el índice de refracción del núcleo (n1) y el índice de refracción del revestimiento (n2). Toda la luz incidente menor a  $\Theta_{max}$  es propagada por el interior de la fibra sin que se produzca refracción, habiendo solo rayos reflejados, conocido como el fenómeno de la reflexión total interna, es decir, cualquier onda que entre con un ángulo mayor al ángulo de aceptancia escapará a través del revestimiento, por lo que la fibra solo captura toda onda de luz que este dentro del cono de aceptancia (Fig. 3.11).

Cuando la luz pasa de un material a otro, se cambia su dirección. De acuerdo con la ley de *Snell*, el nuevo ángulo del rayo de luz se puede predecir a partir de los índices de refracción de los dos materiales.



FIGURA 3.11: Apertura numérica [47].

El concepto de apertura numérica se usa para describir la potencia colectora de luz de la fibra y para calcular la eficiencia de acoplo fuente/fibra, por lo que interesa que sea grande. Está definido como:

$$A.N = n \cdot sen(\Theta_{max}) = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$$
 (3.1)

donde  $\Theta_{max}$  representa el máximo ángulo de aceptación y n es el indice de refracción del medio, en general aire por lo que n = 1.

## 3.1.2.5. Lente biconvexa

La KBX046 N-BK7 es una lente biconvexa sin recubrimiento, 1 pulgada (25,4 mm) de diámetro. La lente biconvexa N- BK7 tiene una longitud focal efectiva de 25,4 mm. Está diseñado para satisfacer los exigentes requisitos de las aplicaciones de electro-óptica láser. Están fabricados con vidrio óptico bien recocido y se pulen a estrechas tolerancias utilizando placas de prueba

para asegurar la mínima distorsión del frente de onda. Sus características mas representativas se encuentran en la tabla 3.4.



FIGURA 3.12: Lente biconvexa N-BK7 [48].

Especificaciones	
Modelo	KBX046
Forma de lentes	Bi-convexo
Diámetro	1,00 pulg. (25,4 mm)
Material de cristales	N-BK7
Revestimiento antirreflectante	Sin recubrimiento
Longitud focal efectiva	25,4  mm
f/#	1.0
R	24.397 mm
Centro Espesor	10.132 mm
Те	3,0 mm
BFL	21,80 mm
P2	-3.59 mm
P1	$3.59 \mathrm{~mm}$
Claro Apertura	$\geq$ central 90 % del diámetro
Centro Espesor (Tc ) Tolerancia	$\pm 0,1mm$
Tolerancia de longitud focal	$\pm 1 \%$
Limpieza	Métodos no abrasivos.
	Se recomienda acetona o
	alcohol isopropílico sobre la lente.

TABLA 3.4: Detalles y especificaciones de la lente Biconvexa KBX046 N-BK7 [48].

La montura que se usó para esta lente es LMR 1/M del fabricante thorlabs, las características de la montura se aprecia en la tabla 3.5.

Item	Optic Diameter	Máx Optic Thickness	Clear Aperture	Optical Height
LMR 1/M	$\emptyset 1$ " or $\emptyset 25mm$	0.28"(7.1  mm)	$\emptyset 0,90$ " ( $\emptyset 23,0mm$ )	0.87"(22.1  mm)

TABLA 3.5: Especificaciones de la montura LMR 1/M de la lente [49].



FIGURA 3.13: Características de una lente biconvexa convergente [48].



FIGURA 3.14: Transmisión de la lente en función de la longitud de onda [48].



FIGURA 3.15: Montura LMR 1/M del fabricante thorlabs [49].

### 3.1.2.6. Lente colimadora

El colimador F220SMA-A esta pre-alineado para colimar la luz desde una fibra terminada en SMA 905 con el rendimiento de difracción limitada. Debido a que estos tipos de colimadores de fibra no tienen partes móviles, son compactos y fáciles de integrar en una instalación existente. Debido a la aberración cromática, la longitud focal efectiva (EFL) de la lente asférica es dependiente de la longitud de onda. La longitud de onda de diseño indica la longitud de onda de la divergencia del haz ideales. La lente asférica es alineado para la colimación en la longitud de onda de diseño. Además, la lente asférica tiene un revestimiento AR en ambos lados que minimiza los reflejos de la superficie. Para algunas aplicaciones también pueden ser utilizados en otros longitudes de onda dentro de la gama de revestimiento AR.

El intervalo de temperatura de funcionamiento para estos colimadores es -40 °C a 93 °C. El colimador funciona mejor para fibras monomodos pero también se puede utilizar en fibras multimodos con un núcleo pequeño y una AN baja.

Características

- Conector SMA 905
- Alineado a la longitud de onda de 543 nm
- Simplifica los sistemas de detección de fibra-Coupled
- Carcasa de acero inoxidable (No magnético)



FIGURA 3.16: Lente colimador F220SMA-A [50].

Especificaciones						
Item #	Alignment Wavelength	AR $Coating^a(nm)$	$D^{b}(mm)$	$\Theta_c$	$AN_{lente}$	f(mm)
F220SMA-A	543 nm	350 - 700 (A)	2.0	$0.020 + 0.01 / -0.00^{\circ}$	0.25	$10.9 \mathrm{mm}$

TABLA 3.6: Características del colimador F220SMA-A [50].

El ángulo de divergencia que figuran en las tablas de especificaciones es el ángulo de divergencia del haz teórica cuando se utiliza el colimador de fibra en su longitud de onda de diseño con la fibra 460hp (543 nm) [50]. Este ángulo de divergencia es fácil para aproximar teóricamente mediante la fórmula que se muestra a continuación, siempre y cuando la luz que emerge de la fibra tenga un perfil de intensidad de Gauss.

El ángulo de divergencia (en grados):

$$\Theta \approx (\frac{D}{f})(\frac{180}{\pi}) \tag{3.2}$$

Donde D y f tienen que estar en las mismas unidades

#### 3.1.2.7. Material de referencia

Los materiales con alta reflectividad y que son utilizados para obtener espectros de referencia son llamados estándares de reflectancia. El mejor material diseñado para estandarizar la respuesta en reflectancia difusa de los materiales es el *Spectralon* (Fig. 3.17).



FIGURA 3.17: Formato Comercial del Spectralon (imagen del fabricante) [51].

El Spectralon es térmicamente estable, químicamente inerte, resistente y lavable, por lo que es resistente al agua. El Spectralon es una resina termo-plástica basada en un fluoro-polímero que ofrece valores de reflectancia difusa más altos de cualquier sustancia conocida y suministran datos de reflectancia difusa de 250 nm a 2500 nm con niveles de 2-99 %, con espectro plano sobre el espectro UV-VIS-NIR. Se utilizan para calibrar espectrofotómetros, dispersómetros BRDF, espectróradiometros y reflectrómetros.

Dicho esto, se eligió el Spectralon SRS-99-020 (Fig. 3.18), producidos por el fabricante *Labsphere*, ya que su reflectancia es mayor que el 95 % en el rango 250-2500 nm, llegando incluso al 99 % en el rango de 400-1500 nm con variaciones de  $\pm 4$  %.



FIGURA 3.18: Datos de reflectancia del Spectralon en la escala de grises [52].

## 3.2. Metodología

Lo primero que hay que hacer antes de realizar cualquier medida es abrir el puerto serie en el ordenador desde Matlab y a continuación calibrar los motores para determinar el inicio y fin de carrera de cada uno de ellos. A continuación calibrar el espectrómetro y luego hacer una corrección para cada medida que se realice. Al finalizar la medida se debe cerrar el puerto serie para no dejarlo bloqueado.

## 3.2.1. Configuración del puerto serie: RS-232

Para inicializar la comunicación RS-232 hay que tener en cuenta como se transmiten los comandos *Venus-2* al controlador y como se recibe la información desde los controladores (Fig. 3.27).

Para la transmisión, los comandos Venus-2 deben terminar con un espacio en blanco (SP).

```
[Parámetro]SP[Indice del eje]SP[Comando Venus-2]SP
```

Para la recepción, los datos que se entregan por el controlador siempre terminan con ASCII (CR) y (LF).

[1st parámetro]SP[2st parámetro]SP[n-parámetro]CR LF

```
>> motorPI=calibracion puerto
   Serial Port Object : Serial-COM1
   Communication Settings
      Port:
                           COM1
      BaudRate:
                           19200
      Terminator:
                           {'CR/LF','''}
   Communication State
      Status:
                           open
      RecordStatus:
                           off
   Read/Write State
      TransferStatus:
                           idle
      BytesAvailable:
                           0
      ValuesReceived:
                           0
      ValuesSent:
                           Ο
```

FIGURA 3.19: Salida de Matlab para la configuración del puerto.

### 3.2.2. Calibración de los motores

Tras el encendido del controlador se requiere de unos 4 segundos para que éste, este en un estado adecuado. El tiempo se divide en dos partes:

- Tiempo de espera si se realiza una actualización de firmware.
- Tiempo de arranque hasta que el motor se active.

Normalmente los controladores vienen ya configurados de fábrica, pero en el caso de tener más de un controlador tendrán que ser etiquetados con un *axisnumber* que será la dirección del controlador. No obstante, la configuración actual de los controladores vienen en un fichero \*.txt (Fig 3.20).

> Settings for Axis.: #% Current axis-No.: 2 Serialnumber....: 12051943 Version....: 4 2 2 Options..... 0 Status..... : 0 Position..... : 26.000000 Switch-Status....: 00 Limits..... 0.000000 51.617266 Error..... 0 Stack..... 0 1 % setaxis 1.0000 % setpitch 13.000000 % snv 200.000 % sna 300.000 % setnstopdecel 5.000000 1 % setncalvel 0.100000 2 % setncalvel 5.000000 1 % setnrmvel 0.100000 2 % setnrmvel 0.000000 % setncalswdist 3200 % setumotmin 90 % setumotgrad 1 0 % setsw 1 1 % setsw 0 % setmotiondir -1000.000000 1000.000000 % setinilimit

FIGURA 3.20: Configuración actual de uno de los controladores.

Con el comando *ncalibrate (ncal)*, se determina el origen y el limite inferior del eje seleccionado, aunque tanto el origen como el limite inferior se pueden cambiar mediante otros comandos. Con el comando *nrangemeasure (nrm)*, se determina el limite superior del eje seleccionado.

Para obtener el limite inferior y superior de los dos motores hemos sincronizado los dos ejes mediante una máscara de eje (Fig 3.28).

$$AxisMask[n][m] = -(2^{n-1}) - (2^{m-1}) \qquad AxisMask = [-1 - -65535]$$
(3.3)

### 3.2.3. Calibración del espectrómetro

Para obtener el espectro de referencia se hace incidir la luz de la fuente sobre un material que tenga una alta reflectividad (que idealmente sea del 100 %) y posteriormente capturar la luz que es reflejada por dicho material.

Como material de referencia se puede utilizar la alúmina aunque hay otros materiales con respuesta más plana, como el sulfato de bario  $(BaSO_4)$ , oxido de magnesio (MgO) o el Spectralon.

En este proyecto, se ha utilizado el Spectralon SRS-99-020 (Apdo. 3.1.2.7).

Para realizar una captura con el espectrómetro ya sea para la fuente o para cualquier muestra, se hizo un ejecutable que lo hemos obtenido del proyecto fin de carrera de Eusebio [29], este ejecutable pasa como parámetros el tiempo de integración y el nombre del archivo de salida.

El programa de este ejecutable utiliza los drivers Omnidriver proporcionados por el fabricante, estos driver están en creados en java lo cual sirve para cualquier sistema operativo permitiendo hacer el ejecutable.exe en distintos lenguajes (C, C++, C#, Pascal, Delphi, LabVIEW, Visual Basic) comunicándose por librerías.

Este ejecutable fue programado en C++ en el entorno de Visual C++ de Windows que permitió enlazar la librería del espectrómetro para el sistema operativo de Windows (.dll) y las cabeceras para C++ (.h) con código del programa.

También fue necesario tener instalado el JDK (Java Development Kit) que incorpora las librerías de java necesarias para poder desarrollar aplicaciones y que funcione correctamente la plataforma java.

Se ha establecido el tiempo de integración del espectrómetro, como el tiempo donde la cuantificación del espectro capturado del Spectralon sea máximo sin superar la cuenta limite del espectrómetro (16000). De esta forma, se aprovecha todo el rango de trabajo del espectrómetro para obtener la máxima precisión posible.

Para obtener este tiempo hemos tenido que hacer un barrido en el tiempo de integración capturando la reflectancia difusa del Spectralon y comprobarlo con la cuenta máxima como se ve en el diagrama de flujo 3.29.

El programa que calibra el espectrómetro devuelve el tiempo de integración, el espectro de la fuente y el espectro de oscuridad (Fig. 3.21), estos dos últimos se utilizará para la corrección de la medida (Apdo. 3.2.4).



FIGURA 3.21: (Izquierda) Espectro de la fuente de luz halógena. (Derecha) Ruido de fondo.

Recuerda que el tiempo de integración es el tiempo que permanece capturando la intensidad de cualquier muestra, que está comprendido entre 3 milisegundos y 65 segundos como se ve la tabla 3.1.

## 3.2.4. Corrección de los espectros

Al medir los espectros de una muestra, fruto de la interacción de la fuente y la muestra, estos vienen determinados prácticamente por todos los elementos ópticos del sistema: fuente, fibra, lentes y espectrómetro,  $B(\lambda)$ , con alguna modificación producidas por la muestra o por el ruido eléctrico, o la luz presente en el lugar donde se lleve a cabo la medición, entre otros.

Para caracterizar la muestra de forma adecuada, es necesario eliminar la característica de la fuente para tener una caracterización de la muestra que no dependa de esa fuente en concreto. También se debe tener en cuenta que luz re-emitida que es capturada puede ser "contaminada" por el ruido de fondo o de oscuridad, pues hay que tener presente que el espectrómetro está hecho con elementos semiconductores, los cuales por efecto de la temperatura, pueden sufrir ionización térmica, produciéndose un flujo de electrones que el sistema interpretará como la incidencia de un fotón (Fig. 3.21).

Aunque la ionización térmica y el ruido de fondo (ruido blanco) sean de carácter aleatorio, su influencia provoca un offset en las mediciones realizadas, por lo que es necesario medir el espectro de fondo  $N(\lambda)$ , es decir, capturar el espectro obtenido por el sistema en ausencia de la fuente de luz (tapando la recepción de captura) y restárselo al espectro de referencia y a cada medición realizada.

Una vez obtenido el espectro del ruido de oscuridad o de fondo y el espectro de la fuente (Apdo. 3.2.3) se corrige el espectro medido con la siguiente ecuación:

$$S(\lambda)_{corregido} = \frac{S(\lambda)_{medido} - N(\lambda)}{B(\lambda) - N(\lambda)}$$
(3.4)

Con esta corrección lo que se consigues es eliminar la dependencia de la fuente de luz, el ruido de fondo y otros elementos del sistema, con la dependencia del rango espectral que nos determina el espectrómetro. Debido a la sensibilidad del CCD (Fig. 3.4), el espectrómetro no capta la suficiente intensidad habiendo en los extremos más ruido, haciendo que la corrección en esa zona este distorsionada. Esto implica que el rango espectral de las medidas quedará limitado a un rango menor que el nominal, resultando ser entre 450 nm y 750 nm.

A pesar de realizar la corrección del espectro, se puede apreciar en algunas zonas algunos picos que pueden deberse a la luz ambiente, o alguna otra fuente presente.

### 3.2.5. Obtención del diámetro de spot

Para obtener el espectro global de una muestra, se ha tenido que montar los dos motores en eje XY para ir barriendo la muestra capturando paso a paso. La cuestión es que paso es el adecuado para caracterizar la muestra sin que se pierda información, este paso lo vamos a determinar como el diámetro de spot para evitar que espectro adyacentes de la muestra se solapen.

Los pasos a seguir para medir el área de iluminación (área del spot) es siempre igual independientemente del montaje que se quiera utilizar, ya que se basa en la cantidad de potencia captada mientras desplazamos de manera lineal una muestra que consta de blanco y negro. Esta muestra tiene como blanco, una placa de alúmina, ya que es un elemento que refleja bien la luz y como negro, una cartulina de dicho color ya que no es un buen reflector.

Cuando el sistema de captura este en la zona del blanco, la potencia captada será máxima, al ir desplazándose llegará a la zona comprendida entre blanco-negro lo cual la potencia habrá decaído con respecto a la anterior y cuando este en la región del negro, la potencia será mínima.(Fig.3.22)



FIGURA 3.22: Posiciones del spot sobre la muestra Blanco-Negro.

Para la medida del diámetro de spot se barre una muestra de blanco-negro que nos da una curva de la potencia capturada, de este barrido obtenemos una medida del diámetro de spot. Luego se ajusta esta curva de captura a la función de probabilidad gaussiana acumulada o función de distribución y mediante este ajuste se obtiene dos ajustes al diámetro de spot (Fig. 3.30). A continuación se explican la obtención de los tres diámetros de spot posibles:

• Antes de nada, se hace un recorrido de la muestra blanco-negro con un motor en un eje.

El primer paso del motor es un paso grande para identificar el codo superior (punto antes y después del 95 %) y el codo inferior (punto antes y después del 5 %). Una vez encontrado los codos, si la distancia entre los codos es relativamente pequeña, se hace un barrido fino entre el codo superior y el codo inferior (Fig 3.23). En caso contrario, el barrido fino se hará para cada codo por separado (Fig. 3.24).

De esta forma queda determinado el diámetro de spot como la distancia comprendida en la zona donde la potencia de luz captada varía en el rango desde 95% y 5%.



FIGURA 3.23: Captura de la muestra blanco-negro para un spot pequeño.



FIGURA 3.24: Captura de la muestra blanco-negro para un spot grande

• El primer ajuste se obtiene como la distancia comprendida entre el 95 % y 5 % de la función de distribución acumulada para la distribución normal.



FIGURA 3.25: Función de Distribución Acumulativa para la distribución normal [53].

 El segundo ajuste se obtiene de la potencia normalizada. Como el diámetro de spot se obtiene de la diferencia entre el desplazamiento del 95 % al 5 % de potencia, la potencia acumulada es del 90 %.

Para obtener el 90 % de potencia como el área bajo la curva normal existen tablas estadísticas que están contenidas dentro de cualquier número de desviaciones estándar (más o menos) a partir de la media [54]. Con esta tabla podemos determinar el área o la probabilidad de que la variable aleatoria distribuida normalmente esté dentro de ciertas distancias a partir de la media. Estas distancias están definidas en términos de desviaciones estándar. Observando la tabla, obtenemos el 90 % del área bajo la curva como  $\mu \pm 1,65\sigma$ . Por tanto, se ajusta el diámetro de spot como  $2 \cdot 1,65\sigma$ .



FIGURA 3.26: Estas gráficas muestran tres formas diferentes de medir el área bajo la curva normal [54].

### 3.2.6. Medidas con desplazamiento XY

El objetivo del desplazamiento de los motores en XY es hacer una imagen espectral del tejido (Fig. 3.31), obteniendo el espectro en cada punto. Lo que obtenemos con esto, es una matriz con los espectros en cada punto para luego compararlo con una fotografía del tejido que analizamos.

El resultado es muy parecido a la descomposición de una imagen hiperespectral. La diferencia es que un sistema hiperespectral recopila y procesa información a lo largo de todo el espectro electromagnético, dividiendo el espectro en muchas bandas, mientras que en este caso simplemente se obtiene el espectro en varios puntos del tejido.

En este trabajo, se controla el espectrómetro y los motores por medio de sus controladoras de forma sincronizada para capturar todo los espectros de la muestra moviéndose en XY. Los motores pueden recorrer desde la posición (0 mm,0 mm) realizando un movimiento en forma de matriz por columnas hasta la posición máxima (51 mm,51 mm), con paso igual al diámetro de spot que se haya calculado para la distancia sistema receptora-muestra.

Los motores empiezan barriendo el eje-Y desde la posición inicial hasta final de carrera, luego el eje-X se mueve una distancia igual al diámetro de spot para que el eje-Y vuelva a barrer la siguiente columna, para no perder tiempo a que el motor del eje-Y vuelva a su posición inicial y empiece a barrer nuevamente, lo que hemos hecho es aprovechar el regreso del motor en el eje-Y para seguir capturando. Para una correcta captura hay que sincronizar muy bien para evitar mover el motor mientras el espectrómetro está capturando o mientras el motor esta en movimiento empezar a capturar. Por eso entre paso y paso de los motores se debe esperar el tiempo de integración para seguir con la siguiente captura.

## 3.2.7. Sistema automatizado

Para hacer las medidas de forma más cómoda y rápida, se hace un sistema automatizado comunicando cada una de los algoritmos explicados anteriormente. Este sistema necesita algunos datos para proceder con la ejecución del programa que automatiza la captura, como la altura y la ruta de la carpeta donde se guardarán las capturas. Partiendo de estos datos el sistema empezará a comunicarse con cada algoritmo terminando con la representación del espectro global de la muestra. Se muestra en la figura 3.33 un esquema del montaje que se ha utilizado.

El protocolo interno que sigue el programa automatizado para obtener el banco de medidas es el siguiente (Fig. 3.32):

- 1. Abrir el Puerto: La configuración de este puerto (Apdo. 3.2.1).
- 2. Calibrar el Espectrómetro: El programa interacciona con el usuario, indicándole lo que tiene que hacer para la obtención del espectro blanco, del espectro oscuro y el tiempo de integración (Apdo. 3.2.3).
- 3. Obtención del diámetro de spot: De igual forma, volverá a pedir al usuario que coloque la muestra de blanco y negro para calcular el diámetro de spot a dicha altura (Apdo. 3.2.5).
- 4. Barrido XY y Captura: Antes de capturar pedirá al usuario que coloque el tejido, luego se crea una carpeta "captura" dentro de la carpeta que proporciono el usuario y se guarda en ella cada una de las capturas que se vayan realizando según el recorrido (Apdo. 3.2.6).
- 5. Corrección de los espectros: Crea otra carpeta "corregida" dentro de la carpeta que nos dio el usuario para la corrección de la carpeta "captura" (Apdo. 3.2.4).
- 6. Representación de lo espectros: Para la representación del espectro global de la muestra, se va leyendo cada muestra corregida de la carpeta que la contiene. Más adelante se detalla mejor las representaciones.

En definitiva, antes de capturar el espectro de cualquier muestra, se debe apagar cualquier luz ambiente permaneciendo solo la fuente de luz con la que haremos la medida. A continuación ejecutar el programa automatizado (Fig. 3.32.



FIGURA 3.27: Diagrama de flujo para la configuración del puerto.



FIGURA 3.28: Diagrama de flujo para la calibración de los motores.



FIGURA 3.29: Diagrama de flujo para la calibración del espectrómetro.



FIGURA 3.30: Diagrama de flujo para la obtención del diámetro de spot.



FIGURA 3.31: Diagrama de flujo para el desplazamiento XY de los motores.



FIGURA 3.32: Diagrama de flujo para el sistema automatizado.



FIGURA 3.33: Esquema del montaje.

## Capítulo 4

# Sistemas de Captación

## 4.1. Introducción

En este capítulo se captura la reflexión difusa de la luz para obtener el área de captación de forma automática e independiente del sistema de captación y dado que el área depende del diámetro, se estudia la dependencia del diámetro con la distancia a la muestra.

Para conocer el tamaño del área de iluminación/captación de la fibra hay que saber la distancia fibra-muestra y la apertura numérica de la fibra. Sin embargo, el sistema de iluminación/captación no siempre va a ser una fibra o no siempre se conocerá la distancia entre el sistema de captación y la muestra, en este caso, conocer el diámetro de spot resulta más complicado como antes.

En el capítulo anterior se explicó el método para la obtención del diámetro del spot independiente del sistema de captación (Apdo. 3.2.5). Como fuente de iluminación se utilizó un foco halógeno (Apdo. 3.1.2.3) de gran potencia para que ilumine de forma uniforme toda la muestra blanco-negro.

La medida de cada sistema de captación no ha sido complicado pero si trabajoso porque para cada sistema se tiene que calibrar el espectrómetro y luego hacer un barrido en distancia. Al variar la distancia manualmente de los componentes ópticos, una mala colocación puede provocar una medida incorrecta sobre todo con los sistemas de lente biconvexa, lo cual implica volver a hacerla. Además, se tuvieron que hacer varias medidas para asegurarnos que la medida no varía demasiado y dar unos resultados validos.

Obtener el diámetro de spot lo más preciso posible permite automatizar el sistema de captación de reflectancia, moviendo el tejido la magnitud del diámetro de spot calculado para que no haya solapamiento entre espectros contiguos.

## 4.2. Captación con fibra óptica al aire

Para calcular el área de captación o el diámetro de spot en función de la distancia, basta con saber la apertura numérica o el ángulo de aceptancia ya que están relacionadas mediante la ecuación 4.1



FIGURA 4.1: Diámetro de spot teórico.

El diámetro de spot se calcula como:

$$\varnothing'_{spot} = \varnothing_{fibra} + 2 \cdot b = \varnothing_{fibra} + 2 \cdot d \cdot \tan(\theta_{max})$$
(4.1)

Siendo  $\theta_{max} = 12.7^{\circ}$ , dado por el fabricante, el  $\emptyset_{spot} = 300 \mu m$ , y *d* la distancia entre la fibra-muestra como variable independiente (Fig. 4.1). La ecuación que define el  $\emptyset_{spot}$  linealmente con la distancia es:

$$\varnothing'_{snot} = 0.3 + 0.4507 \cdot d \ [mm] \tag{4.2}$$

En este montaje se toman medidas del diámetro de spot para alturas entre 1 y 15 cm, recorriendo la muestra blanco-negro con un paso de 0.25 mm en el motor (Fig. 4.2). Debido al paso del motor, el diámetro de spot es menor que el que medimos realmente, con un error máximo de 0.5 mm, este error se puede disminuir, disminuyendo el paso del motor pero implica mayor tiempo de cómputo.

Para que la relación del diámetro del spot con la altura sea lineal, la fibra se debe colocar lo más perpendicular posible a la muestra, para que así, la luz no incida en ángulo. En el caso de que la luz incida en ángulo, puede que el spot sea elíptico en vez de circular y que la potencia capturada no sea lineal con la altura.

Los diámetros calculados a partir de las medidas mantienen una cierta dependencia lineal con la distancia fibra-muestra, pero esta zona de captura (spot) es menor que la teórica, es decir,



FIGURA 4.2: Montaje para calcular el diámetro de spot con fibra.



FIGURA 4.3: Diámetro de spot de la fibra. Negro: Teórico (óptica geométrica). Azul: Ancho (5-95 %). Rojo: Ajuste de la fda (5-95 %). Verde: ajuste de la fda a 2\*1.65\*sigma.

que para distancias mayores a 1 mm, el spot es en realidad menor de lo que indica la óptica geométrica (Fig. 4.3), ¿pero porqué sucede esto?.

Esta diferencia que existe se debe a varias circunstancias ya que en el caso teórico no se tienen en cuenta las pérdidas que pueden existir en distribución de la luz por la fibra, ya sea por su longitud, por curvatura, por el ángulo de incidencia de los rayos a la fibra, entre otras. A continuación se explica que ocasiona esta diferencia.

En la óptica geométrica, el área de captura es todo el spot debido al ángulo de aceptancia máxima de la fibra. Sin embargo, en las medidas, esta área es menor. Esto se debe a que la
distribución de la luz no es uniforme cuando viaja por la fibra ya se<br/>a a su entrada, interior  ${\rm o}/{\rm y}$  salida de la misma.

Además, la potencia varía según el ángulo de incidencia, decreciendo progresivamente al aumentar el ángulo (Fig. 4.4), es decir, para rayos de luz con ángulos pequeños cercanos a cero viaja mayor potencia que aquellos que tienden al ángulo de aceptancia, siendo la potencia en estos rayos prácticamente nulos, los cuales no aporta información necesaria para el cómputo global. Por otro lado, la potencia decrece conforme aumenta la distancia fibra-muestra de forma lineal (Fig. 4.5).



FIGURA 4.4: Potencia acoplada en función del ángulo.



FIGURA 4.5: Potencia normalizada en función de la distancia fibra-muestra.

En definitiva, el spot que se ha medido es menor que el spot de la óptica geométrica y el spot efectivo es menor aún que el medido.

# 4.3. Captación con Colimador

En este caso, el área de captación teórico debe ser constante e independiente de la distancia de la lente colimadora a la muestra.

En este montaje se acopla a la fibra desnuda un colimador (Fig. 4.6) y se realizó medidas para alturas inferiores a los 40 cm debido al tamaño del poste, recorriendo la muestra blanconegro con un paso de 0.25 mm produciendo un error máximo de 0.5 mm en el calculo real del diámetro de spot.



FIGURA 4.6: Montaje para calcular el diámetro de spot con una lente colimadora.

El aumento del área de captura con un colimador se debe a que el ángulo de aceptancia no es idealmente cero sino que tiende a cero (Fig. 4.7), este pequeño ángulo de aceptancia hace que el spot aumente poco a poco a medida que se aleja de la muestra (Fig. 4.8).



FIGURA 4.7: Ángulo de aceptancia de la fibra vs ángulo de aceptancia del colimador.

En cuanto a la potencia, si en vez de capturar se emite luz, a la salida de la lente colimadora tenemos haces paralelos de la luz que emite la fibra, pero en este caso la luz se captura por lo



FIGURA 4.8: Diámetro de spot del colimador. Azul: Ancho (5-95 %). Rojo: Ajuste de la fda (5-95 %). Verde: ajuste de la fda a 2\*1.65\*sigma

que los rayos reflejados de la muestra pasan por la lente colimadora dirigiéndose con un cierto ángulo hacia la fibra. Se considera que el ángulo de los rayos que redirige la lente colimadora a la fibra son siempre menores al ángulo de aceptancia de la fibra por lo que la potencia decrece poco a poco debido a la pequeña divergencia del mismo colimador (Fig. 4.9).



FIGURA 4.9: Potencia normalizada en función de la distancia colimador-muestra.

# 4.4. Captación con Lente Biconvexa

En este otro sistema, lo primero es focalizar la muestra. Para ello se utilizó una fuente de luz auxiliar para que así incida sobre la lente un frente de ondas y se varía la distancia lente-muestra hasta obtener la mejor focalización de la luz en la muestra que resulto estar a una altura de 2.2 cm aproximadamente. De esta manera, se mantendrá fija la lente siendo la fibra la que varié en altura respecto a la lente. Otra manera de calcular la distancia focal es usando el sol como fuente (Fig. 4.10).



FIGURA 4.10: Medida experimental de la distancia focal [55].

Para obtener medidas del área de captación, se coloca la fibra por encima de la lente (Fig. 4.11) y se mide el diámetro de spot hasta alturas inferiores a 11 cm con un paso de motor de 0.25 mm. En este montaje hay que tener especial cuidado en la alineación entre la fibra y la lente, ya que si la fibra no apunta de al centro de la lente, el área del spot puede salirse de la lente, tomando así medidas erróneas. De igual forma, la lente tiene que estar perpendicular a la fibra ya que una inclinación puede hacer que la obtención del diámetro de spot no sea la adecuada.

Cuando se realizaron estas medidas, se observó que para alturas superiores a 11 cm el área de captación aumentó de forma brusca o hacía una medida errónea, en vez de seguir disminuyendo. Esto se debe a que el área de captación de la fibra aumenta conforme lo hace la distancia, entonces se llegará a una distancia, donde el área sea mayor que el tamaño de la propia lente. Se sabe que la montura de la lente tiene un diámetro óptico de 25 mm, este tiene que ser el área máxima que tiene que capturar la fibra para no capturar fuera de la lente aunque lo ideal sería que no superase el diámetro del claro de lente que es de 23 mm. Para una fibra situada a 12 cm de distancia a la muestra, tenemos un diámetro de spot de 31 mm aproximadamente (Fig. 4.3), pero como la lente biconvexa se ha colocado a una distancia de la muestra de 2.2 cm y el grosor de la montura de la lente es de 1 cm, entonces la distancia entre la fibra y la lente es de



FIGURA 4.11: Montaje para calcular el diámetro de spot con una lente biconvexa-fibra.



FIGURA 4.12: Diámetro de spot de la fibra a la muestra mediante una lente biconvexa. Azul: Ancho (5-95 %). Rojo: Ajuste de la fda (5-95 %). Verde: ajuste de la fda a 2\*1.65\*sigma

11 - (2,2+1) = 7,8 cm, por tanto, el diámetro de spot que observa la fibra sobre la lente está entre 24.25 mm y 25.6 mm (Fig. 4.3). Mientras que para una altura de la fibra a la muestra de 10.2 cm se tiene un diámetro de spot sobre la lente de 24.25 mm. (Fig. 4.3)

En cuanto a la potencia, va decreciendo según aumenta la altura de forma lineal, por el mismo motivo que se explicó en el sistema de captación de la fibra (Apdo. 4.2) y además, al estar más alejado esta cubriendo un área menor de posible reflexión difusa, captura menos ángulos.



FIGURA 4.13: Potencia normalizada en función de la distancia fibra-(lente)-muestra.

# 4.5. Captación con Lente Biconvexa y Colimador

En este último sistema, se combina la lente biconvexa con el colimador (Fig. 4.14) para intentar obtener una mejor focalización que en los sistemas anteriores. En este montaje, al igual que el sistema de captación con lente biconvexa-fibra (Apdo. 4.4), hay que tener mucho cuidado con la colocación y alineamiento de los componentes para una correcta medida.

Recuerda que la lente biconvexa se debe mantener a distancia fija de la muestra, la distancia focal. Y es la colimadora la que varía su distancia con la biconvexa.



FIGURA 4.14: Montaje para calcular el diámetro de spot con una lente biconvexa-colimador.

En un principio, se utilizó el mismo paso de 0.25 mm en el motor y se observó que el área de captación era muy pequeño. Así que, para minimizar el error, se decidió utilizar un paso de motor mucho más fino, de 0.1 mm, para que el error máximo sea de 0.2 mm.



FIGURA 4.15: Diámetro de spot del colimador a la muestra mediante una lente biconvexa. Diámetro de spot de la fibra: Azul: Ancho (5-95%). Rojo: Ajuste de la fda (5-95%). Verde: ajuste de la fda a 2\*1.65\*sigma

Con este sistema se ha llegado a obtener un diámetro de spot de 1 mm, permaneciendo prácticamente constante con el aumento de la distancia a la muestra (Fig. 4.15). La distancia del colimador a la muestra está limitado por el poste al igual que el sistema de captación del colimador (Apdo. 4.3). Para una altura de 37 cm del colimador a la muestra, el diámetro de spot es de 9.75 mm (Fig. 4.3) inferior al diámetro de la lente (tabla 3.4), lo cual no habría problema alguno.

La potencia normalizada no es constante debido al posicionamiento manual, ya que es muy probable que la colimadora no apunte siempre al centro de la biconvexa.

### 4.6. Área de captación óptima

El estudio de estas medidas tiene el objetivo de determinar el desplazamiento  $\Delta d$  necesario para capturar espectros en puntos sucesivos de una muestra sin solapar información. Según la óptica geométrica la distancia entre capturas adyacentes deber ser al menos el diámetro de spot,  $\emptyset_{terico}$ , teniendo en cuenta esto, el desplazamiento que se aplica entre espectros adyacentes es el diámetro de spot medido, $\emptyset_{medido}$ , por las siguientes dos razones:

1. Es la parte del spot que aporta una potencia significativa.



FIGURA 4.16: Potencia normalizada en función de la distancia colimador-(lente)-muestra.

2. La focalización es más precisa y evita dejar zonas sin caracterizar.



FIGURA 4.17: Esquema del área de captación y distancia entre espectros. a) óptica geométrica (teoría), b) medidas.

# Capítulo 5

# Desarrollo de una interfaz gráfica en Matlab para la medida y análisis de Reflectancia Difusa

El objetivo de este capítulo es desarrollar una interfaz gráfica en Matlab, que se ha denominado **Reflectancia Difusa**, que permite calibrar los dispositivos con interacción del usuario hasta la obtención del espectro de la muestra que se captura.

La interfaz permitirá a cualquier usuario capturar el espectro de una muestra ya que la interfaz es bastante intuitiva y guía paso a paso al usuario durante la obtención de capturas y representación de los resultados. Para ello, se brinda al usuario una serie de opciones al principio hasta llegar a la representación de los espectros sin necesidad de acceder ni manejar los programas de Matlab que pueden resultar complicados para las personas que no conocen el software y lenguaje de Matlab o no tienen amplios conocimientos de programación.

La interfaz gráfica incluirá todos los archivos.m necesarios para ejecutar con éxito cada uno de los pasos. Además de este objetivo, se quiere desarrollar una interfaz que cumpla con las siguientes características:

- 1. Sencilla de utilizar.
- 2. Desarrollo de forma secuencial, de forma que el usuario se sienta guiado a través de la interfaz.
- 3. Calibración previo de los dispositivos.
- 4. Presentación de gráficos de los espectros de la muestra.
- 5. Opciones de guardar la representación gráfica.
- 6. Ayudas, que permitan guiar al usuario.

# 5.1. GUI de Matlab usada para desarrollar la Interfaz

#### 5.1.1. Acerca de Matlab

MATLAB, nombre abreviado de "MATrix LABoratory", es un programa muy potente para realizar cálculos numéricos con vectores y matrices. Como caso particular se utiliza para el control de los dispositivos y representaciones gráficas en 2D.

MATLAB se utiliza ampliamente en [56]:

- 1. Cálculos numéricos
- 2. Desarrollo de algoritmos
- 3. Modelado, simulación y prueba de prototipos
- 4. Análisis de datos, exploración y visualización
- 5. Graficación de datos con fines científicos o de ingeniería
- 6. Desarrollo de aplicaciones que requieran de una interfaz gráfica de usuario (GUI, Graphical User Interface).

Matlab puede llamar a una gran variedad de funciones, tanto propias como programadas por los usuarios, que es el caso ya que se va a utilizar los programas que se empleó en el sistema automatizado (Apdo. 3.2.7).

#### 5.1.2. Interfaz gráfica. GUI

Matlab permite desarrollar fácilmente un conjunto de pantallas (paneles) con botones, menús, ventanas, etc., que permiten utilizar de manera muy simple programas realizados dentro de este entorno. Este conjunto de herramientas se denomina interfaz gráfica de usuario (GUI).

La elaboración de GUIs puede llevarse a cabo de dos formas, la primera de ellas consiste en escribir un programa que genere la GUI (script), la segunda opción consiste en utilizar la herramienta de diseño de GUIs, incluida en el Matlab, llamada GUIDE [57].

En esta sección se abordarán esta última por facilidad de manejo.

#### 5.1.2.1. Propiedades de los objetos

Todos los objetos de MATLAB tienen distintas propiedades. Algunas propiedades que se ha usado para la elaboración de esta interfaz son, si es visible o no, si está habilitado o no, la posición, y otras propiedades particulares del objeto concreto de que se trate. Las propiedades tienen valores por omisión, que se utilizan siempre que el usuario no indique otra cosa. Algunas propiedades pueden ser modificadas y otras no (*read only*). Hay propiedades que pueden tener cualquier valor y otras que sólo pueden tener un conjunto limitado de valores (por ejemplo, on y off en el caso de los comandos zoom, grid, enable y visible).

Funciones get y set MATLAB dispone de las funciones set y get para consultar y cambiar el valor de las propiedades de un objeto. Las funciones set (identidad) lista en pantalla todas las propiedades del objeto al que corresponde el handle (sólo los nombres, sin los valores de las propiedades). La función get (identidad) produce un listado de las propiedades y de sus valores.

#### 5.1.2.2. Controles de la interfaz gráfica de usuario

Algunos de los controles más usados para esta interfaz son [57]

- **Texto estático (text):** Muestran un string de texto en la caja. Se utiliza normalmente para etiquetar controles, proporcionar instrucciones al usuario o indicar los valores asociados a un control deslizante. Los usuario no pueden cambiar el texto estático interactivamente.
- Menú desplegable (popup): Menús emergentes, muestran una lista de opciones cuando los usuarios hacen clic en la flecha.
- Botón (push): Invoca una acción o evento que será ejecutada por Matlab.
- Botón de radio (radio): Se suele usar en grupo, estos son mutuamente exclusivos, es decir, si un botón de radio está encendido, los demás estarán apagados, para indicar la opción seleccionada.
- Control deslizante (slider): Se usa para representar un rango de valores, permite al usuario mover una barra de deslizamiento.
- Axes: Permite mostrar gráficos e imágenes. Al igual que todos los objetos gráficos.
- Panel: Se usa para organizar los componentes de la GUI en grupos. Al agrupar visualmente los controles relacionados, los paneles pueden hacer la interfaz de usuario mas fácil de comprender

#### 5.1.3. Elaboración de la Interfaz gráfica

GUIDE (Graphical User Interfase Development Environment) es un juego de herramientas que se extiende por completo el soporte de MATLAB, diseñadas para crear GUIs (Graphical User Interfaces) fácil y rápidamente para el diseño a la hora de seleccionar, tirar, arrastrar y personalizar propiedades [58]. Una vez que los controles están en posición se editan las funciones de llamada (Callback) de cada uno de ellos, escribiendo el código de MATLAB que se ejecutará cuando el control sea utilizado.



FIGURA 5.1: Iniciación de MatLab Guide.

# 5.2. Interfaz Gráfica Reflectancia Difusa

#### 5.2.1. Introducción

El objetivo es que el usuario pueda usar la interfaz para realizar una captura a cualquier objeto y tener su espectro por medio de la reflectancia difusa, de manera sencilla y rápida, sin necesidad de un conocimiento profundo de esta técnica.

# 5.2.2. Información que debe conocer el usuario antes de iniciar la interfaz Gráfica

#### 5.2.2.1. Ubicación de los archivos y versiones de MATLAB

Con la documentación del presente Proyecto Fin Carrera se entrega de forma adjunta un Cd de datos que contiene todo lo necesario para que cualquier usuario pueda ejecutar la interfaz gráfica "Reflectancia Difusa". Lo único que necesitará será el programa informático MATLAB junto con los componentes ópticos y drivers correspondientes (Apdo. 3.1.2), este programa se desarrolló en la versión Matlab2013b, y fue probado en Matlab2014a.

Para versiones más antiguas no se garantiza el correcto funcionamiento del programa.

#### 5.2.2.2. Organización del Cd de datos

El Cd de datos que contiene la carpeta "ReflectanciaDifusa" con todos los archivos necesarios para el correcto funcionamiento de la interfaz.

El usuario debe copiar la carpeta "ReflectanciaDifusa" en un directorio seleccionado por el usuario. Por ejemplo, el usuario podría copiar todo en el escritorio de su ordenador.

El contenido de la carpeta "ReflectanciaDifusa" contiene las siguientes subcarpetas "ArchivosInterfaz", "Imágenes", "BDD dspot" y "Ayuda", el contenido de estas subcarpetas es el siguiente:

- ArchivosInterfaz: Contiene todos los programas correspondientes que necesita para ejecutar la interfaz de forma correcta. Esta subcarpeta NO se modificará por el usuario. Si lo hace se puede correr el riesgo de que el programa no funcione y dé errores inesperados.
- Imágenes: Contiene imágenes que se utilizan en la interfaz, algunas son por estética y otras para guiar al usuario.
- **BDD** dspot: Esta subcarpeta tiene archivos .fig que son el resultado de los diámetros de spot obtenidos para cada uno de los sistemas que se ha realizado en este proyecto.
- Ayuda: Esta subcarpeta contiene un archivo pdf llamado Ayuda.pdf, para la ayuda de interpretación del programa.

#### 5.2.2.3. Localización de las carpetas desde el Current Directory de MATLAB

Para poder ejecutar la interfaz, el usuario debe seleccionar como directorio principal del MATLAB, el directorio donde copio la carpeta "ReflectanciaDifusa". Por ejemplo, siguiendo la recomendación de copiar una de estas carpetas en el escritorio de windows, debe aparecer en el *Current Directory* de MATLAB (Fig. 5.2) la siguiente ruta:

 $C: Users \ jhoefrancisco \ Desktop \ Reflectancia$ Difusa



FIGURA 5.2: Directorio Principal de Matlab para ejecutar la Interfaz.

#### 5.2.3. Hitos principales en el uso de la interfaz gráfica

Para utilizar la interfaz gráfica, el usuario debe conocer que de forma general existen las siguientes partes diferenciadas:

#### 5.2.3.1. Pantalla Principal

Para ejecutar la interfaz gráfica, el usuario deberá realizar los siguientes pasos:

- 1. Abrir el programa MATLAB.
- 2. Seleccionar el directorio principal de Matlab (Apdo. 5.2.2.3). Para que el usuario conozca que está en la carpeta correcta, en la barra superior de Matlab debe aparecer, por ejemplo, la secuencia que se muestra en la figura 5.2.
- 3. Escribir el nombre de la interfaz en la línea de comandos (pantalla principal de Matlab), como se muestra en la figura 5.3. Se recomienda que el usuario preste atención al cambio de letra mayúscula-minúscula, debido a que Matlab tiene en cuenta este aspecto.



FIGURA 5.3: Ejecución de la interfaz gráfica.

E1	aspecto	ane	presenta	la	interfaz	gráfica	es el	ane	muestra	la	figura	5.4
דים	aspecto	que	presenta	$\mathbf{a}$	menaz	granca	es er	que	muestra	$\mathbf{a}$	nguia	0.4.

0	presentacion1	- 🗆 🗙
	"Interfaz gráfica para aplicar Reflexión Difusa"	
	Reflectancia Difusa	
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA	Jhoe Francisco Pacheco Vásquez Ingeniería de Telecomunicación Proyecto Fin de Carrera 2014-2015 Grupo de ingeniería Fotónica Universidad de Cantabria	
Funcior	nes disponibles:	
	Comenzar	
	Ayuda	
j. 1.		

FIGURA 5.4: Pantalla principal de la interfaz.

Una vez que el usuario accede a la pantalla inicial de la interfaz, debe elegir entre realizar las opciones que se muestran (Fig. 5.5).

Funciones disponible	S.
	Comenzar
	Ayuda

FIGURA 5.5: Funciones disponibles en la pantalla principal.

- **Comenzar programa:** A partir de este botón, el usuario podrá continuar a la pantalla de Calibración Captura.
- Ayuda: Lo único que tiene que hacer el usuario es pulsar el botón correspondiente y esperar que aparezca la información en un documento con formato .pdf (*Acrobat Reader*) donde podrá consultar cualquier duda respecto a las pantallas de la interfaz y su funcionamiento

Nota importante: Cada vez que el usuario se sitúe en la Pantalla principal, se reiniciarán y se fijarán por defecto todos los valores y parámetros del programa.

#### 5.2.3.2. Calibración Captura

Para abrir esta ventana o pantalla, se ha tenido que pulsar el botón Comenzar de la ventana de Inicio.

	Calibracion_Captura	- 🗆 🗙				
Calibración v Captura						
	Seleccione que desea hacer					
	Analizar una captura guardada					
	Realizar una captura nueva					
Salir Pantalla de Inicio						

FIGURA 5.6: Pantalla de Calibración Captura.

Una vez situados en esta pantalla, el usuario debe elegir entre realizar las opciones que se muestran, Captura Nueva o Captura Guardada (Fig. 5.6). • Captura Nueva: A partir de este botón, empezarán a aparecer menús y ventanas emergentes para llevar a cabo este proceso de calibración (Fig. 5.7)

	Calibracion_Captura	- 🗆
	Calibración y Captura	
Captura Nueva		
Seleccione la Carpeta donde se guardarán las c	apturas High-Res	solution
Ruta de la Carpeta	Examinar Spectron	neter
		Computer
		*
		~
Salir Pantalla de Inicio		

FIGURA 5.7: Pantalla de calibración nueva.

Primero sale un panel de Captura nueva y dentro de ella van apareciendo los siguientes controles (Fig. 5.9):

- 1. Un botón de **Examinar** para seleccionar la carpeta que se creará a priori, donde se guardarán los datos de captura. Preferiblemente nueva o vacía.
- 2. Una vez seleccionado la carpeta, el botón **Examinar** quedará inhabilitado y aparecerá un panel para seleccionar el sistema que se está usando en ese preciso momento.
- 3. Cuando se haya seleccionado un sistema, este panel quedará inhabilitado y aparece una Base de Datos y un slider para seleccionar la altura del sistema a la muestra.
- 4. La altura se elige mediante el slider en centímetros.
- 5. Luego tenemos el botón **Calibrar**, que indicará al usuario como hay que calibrar cada dispositivo indicándole paso a paso lo que tiene que hacer. Fuera del panel aparece un texto estático para indicar que dispositivo se está calibrando
- 6. Una vez calibrado cada uno de los dispositivos, aparece el botón Capturar, realiza la captura de la muestra y cuando termina pasa a la ventana de Análisis.

La base de Datos se corresponde al sistema seleccionado, en la caja negra se representa el diámetro medido, diámetro de ajuste y diámetro sigma, para la altura seleccionada en el menú desplegable. También tenemos un botón de **Ver** por si se desea ver la gráfica para esa altura (Fig. 5.8).



FIGURA 5.8: Superior: potencia normalizada para desplazamientos del motor y ajuste por función de Distribución Acumulativa. Inferior: error de ajuste (residuos).

Fuera del panel hay un botón de **Reset** que inicializa todos los valores por si nos hemos equivocado en alguno de ellos. Quedará inhabilitado mientras se calibra y se captura. También tenemos fuera del panel captura nueva, botones como **Salir** y **Pantalla de inicio**.

Zalibracio	on_Captura – 🗆 🗙					
Calibración y Captura						
Captura Nueva         Seleccione la Carpeta donde se guardarán las capturas         C:\Users\indefrancisco\Desktop\ReflectanciaDifusa\iprueba       Examinar         Que sistema de captura va a usar	Eje de desplazamiento [51 mm] A B C C C C C C C C C C C C C C C C C C					

FIGURA 5.9: Pantalla de calibración nueva con todos los controles.

• Captura guardada: Al pulsar este botón pasa a la pantalla de Análisis.

#### 5.2.3.3. Análisis

Esta pantalla se abre de dos maneras:

- Pulsando el botón Captura guardada de la pantalla Calibración Captura. El usuario tendrá que seleccionar la carpeta que contiene todas las muestras corregidas mediante el botón Abrir.
- 2. Cuando se está realizando una captura nueva, después de la captura pasa automáticamente a esta pantalla representándolas sin necesidad de seleccionar la carpeta.



FIGURA 5.10: Pantalla de Análisis.

En esta pantalla se representan cuatro subplots:

- 1. Representación de la imagen en formato jpg de la muestra si se halla en la carpeta seleccionada.
- 2. Representación de uno de los espectros corregidos.
- 3. Representación de todos los espectros a una  $\lambda$  determinada.
- 4. Representación de la reconstrucción de la muestra a partir de sus espectros.

# Capítulo 6

# Prestaciones de los sistemas de captación y análisis de los resultados

# 6.1. Prestaciones de los sistemas de captación

Las cartas de prueba son útiles al evaluar o calibrar la calidad de imagen de los sistemas ópticos y compararlos entre ellos, para asegurar que sistema proporciona mejores resultados. Cuando los diseñadores ópticos intentan comparar el rendimiento de los sistemas ópticos, una medida comúnmente utilizada es la función de transferencia de modulación (MTF) [59]. MTF se utiliza para componentes como lentes para cuantificar el rendimiento global de imagen de un sistema en términos de resolución y el contraste. En otras palabras, MTF es una manera de incorporar resolución y el contraste en una sola especificación. Por tanto, en este capítulo se va a definir y trabajar con los dos términos de la MTF que son a su vez necesarios para caracterizar verdaderamente el rendimiento de una imagen: la resolución y el contraste.

#### 6.1.1. Caracterización de la calidad de imagen

#### 6.1.1.1. Resolución

La resolución es la capacidad de un sistema de imágenes de distinguir detalles de objetos [60]. A menudo se expresa en términos de pares de líneas por milímetro (donde un par de líneas es una secuencia de una línea de color negro y una línea blanca (Fig. 6.1)). Esta medida de pares de líneas por milímetro (lp/mm) también se conoce como frecuencia. La inversa de la frecuencia produce la separación en milímetros entre dos líneas resuelta.

Una imagen de baja resolución por lo general carece de detalles finos y es a menudo borrosa, mientras que una imagen de alta resolución es muy detallada y clara.



FIGURA 6.1: Relación de la línea de par con una señal cuadrada [60]



FIGURA 6.2: Imagen con diferentes resoluciones [61]

Una forma práctica de entender las líneas pares es pensar en ellos como píxeles, donde una sola línea de par corresponde a dos píxeles (Fig. 6.3). Por tanto, Se necesitan dos píxeles del sensor CCD del espectrómetro para cada línea de par de la resolución: un píxel se dedica a la línea negra y la otra para el espacio en blanco.



FIGURA 6.3: Escenarios de imágenes donde (a) la línea de par no se resuelve y (b) la línea de par se resuelve [60]

En nuestro caso, cada medida espectral, con un desplazamiento en los ejes x e y, tomará la posición de un pixel en la imagen final.

#### 6.1.1.2. Contraste

El contraste es una medida de la separación entre las regiones claras y oscuras de una imagen [60]. Más específicamente, el contraste es un cambio en la intensidad o el brillo de un punto a otro. Afecta a la eficacia con que se reproducen las diferencias entre el objeto y los tonos de gris en el fondo. Una imagen con el mayor contraste es 1, en el que el negro es realmente negro y blanco es realmente blanco, sin matices de gris en el medio. A medida que se reduce el contraste, la diferencia entre el blanco y negro comienza a desdibujarse, en un sentido muy literal, y tonos de gris aparece (Fig. 6.4). El contraste que se expresa a menudo en términos de porcentaje (%) tal como se expresa en la ecuación 6.1. También puede ser representado por una función periódica (es decir, onda cuadrada o de onda sinusoidal), o una función que alterna regularmente y de forma instantánea entre dos niveles.

$$\% contraste = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \cdot 100$$
(6.1)

donde:

- $I_{max}$  es el valor de la intensidad máxima.
- $I_{min}$  es el valor de la intensidad mínima.

Cuando el sistema ya no puede resolver las líneas de par, las áreas blancas y negras tienen el mismo valor, de modo que el %Contraste = 0. Para frecuencias muy bajas,  $I_{max} = 1 \ y \ I_{min} = 0$  por lo que la modulación = 1.



FIGURA 6.4: Contraste en relación con píxeles [60, 62]

Para entender la relación entre el contraste y la calidad de la imagen, con la misma resolución se utiliza una imagen con una mayor frecuencia de línea de par. A medida que la frecuencia espacial de las líneas aumenta, el contraste de la imagen disminuye (Fig. 6.5). Este efecto está siempre presente cuando se trabaja con imágenes de la misma resolución. Para que aparezca la imagen definida, el negro debe ser verdaderamente negro y el blanco verdaderamente blanco, con una cantidad mínima de escala de grises intermedios.



FIGURA 6.5: Comparación de contraste al aumentar la frecuencia [62]

#### 6.1.1.3. Carta de prueba USAF 1951

Para encontrar la resolución límite de los sistemas se utiliza una carta de pruebas típicos que consisten en patrones de barras repetidas. La resolución límite se mide determinando el grupo más pequeño de barras, tanto vertical como horizontalmente, para el que el número correcto de barras puede ser visto, dicho de otra manera, cuando encontremos el elemento donde no puede discernir el blanco del negro es la limitación de su resolución.

La carta de pruebas de resolución que se usa en este proyecto es USAF 1951 [63] que consiste en patrones de prueba conforme a la norma MIL-STD-150A, establecido por la Fuerza Aérea de Estados Unidos en 1951 (Fig. 6.6). El patrón consiste en grupos de tres barras (pequeñas sentencias Ronchi).

Está siendo ampliamente aceptada para probar el poder de resolución de sistemas o equipos ópticos, tales como microscopios, cámaras y escáneres de imágenes, lentes de alta magnificación de vídeo, fluorescencia y Nanotecnología.



FIGURA 6.6: Prueba de resolución de USAF 1951 [63]

El formato de la norma MIL-STD-150A [63] común consiste en seis grupos en tres capas de patrones. Los grupos más numerosos que forman la primera capa, se encuentran en los lados exteriores. Las capas más pequeños repiten el mismo patrón pero son progresivamente más pequeño hacia el centro, la tabla 6.1 muestra los factores de escala para los elementos de un grupo dado el tamaño del primer elemento. Cada grupo se compone de seis elementos, numerados del 1 al 6. Dentro de la misma capa, los grupos impares aparecen contigua del 1 al 6 de la esquina superior derecha. El primer elemento de los grupos de número par se encuentra en la parte inferior derecha de la capa, con los restantes 2 a 6, a la izquierda. Las escalas y dimensiones de las barras están dadas por la expresión 6.2.

$$Resolution(lp/mm) = 2^{grupo + (elemento-1)/6}$$
(6.2)

Elemento del grupo	Factor (matemático)	Factor (numérico)
1	$2^{0}$	1
2	$2^{-1/6}$	0.89090
3	$2^{-2/6}$	0.79370
4	$2^{-3/6}$	0.70711
5	$2^{-4/6}$	0.62996
6	$2^{-5/6}$	0.56123

TABLA 6.1: Factor de escala para cada elemento dentro de un grupo

Cada elemento consiste en dos patrones. Cada patrón estará compuesto de tres líneas separadas por espacios de igual anchura. Cada línea será de cinco veces más largo que de ancho (Fig. 6.7).



FIGURA 6.7: Poder de resolución del elemento [64]

#### 6.1.2. Prestaciones de los sistemas de captación utilizados

En este apartado se a capturar las capas 2 y 3 ([-2 -1] y [0 1]) de la carta de pruebas de USAF 1951 (Fig. 6.8 ), para determinar que sistema es mejor que otro en cuanto a resolución y contraste. La tabla 6.2 muestran la longitud de líneas y longitud de línea par.



FIGURA 6.8: Capas 2 y 3 de USAF 1951 [63]

Para que el CCD del espectrómetro pueda distinguir los patrones de la carta, el paso del motor tanto en el eje-X como en el eje-Y tiene que ser al menos la mitad de un par de línea del patrón que se quiere analizar, de esta forma la resolución viene determinada por el tamaño del pixel que se define como el  $Paso_{eje-x}[mm] \ x \ Paso_{eje-y}[mm]$ .

Longitud de línea [mm] (lp/mm)							
Número de Grupo							
Elemento	-2	-1	0	1			
1	9.5244(3.8098)	4.7622(1.9049)	$2.3811 \ (0.9524)$	$1.1906 \ (0.4762)$			
2	8.4853(3.3941)	4.2426(1.6970)	2.1213(0.8485)	1.0607(0.4242)			
3	$7.5595 \ (3.0238)$	3.7798(1.5119)	$1.8899 \ (0.7560)$	$0.9449\ (0.3780)$			
4	6.7348(2.6939)	3.3674(1.3470)	$1.6837\ (0.6735)$	$0.8418\ (0.3367)$			
5	6.0000(2.4000)	3.0000(1.2000)	$1.5000 \ (0.6000)$	$0.7500 \ (0.3000)$			
6	5.3454(2.1382)	2.6727 (1.0691)	$1.3363 \ (0.5345)$	$0.6682\ (0.2673)$			

TABLA 6.2: Longitud de línea, mm (lp/mm), en función del índice de grupo e índice de elemento

La resolución depende del paso del motor, cuanto menor sea el paso en un eje o en ambos, mayor es la resolución. Sin embargo, para una misma resolución, el contraste depende del área de captación ya que cuanto menor sea el área de captación, mayor es el contraste (Fig 6.9).

Se ha hecho capturas de imagen para cada uno de los sistemas captación con el menor área de captación que se obtuvo en el capitulo 3. Se hizo la captura con dos pasos, un paso igual a su área de captación y otro igual al 20 % del área de captación. El paso del motor es el mismo en el eje-x y en el eje-y.

Para intentar identificar un par de lineas, hay que tener en cuenta que el spot puede estar capturando por una parte, blanco y por otra parte, negro. Si el área que captura de blanco es igual al área que captura de negro, entonces mostrará un gris. Entonces para representar un blanco, el área de B tiene que ser mayor que la suma de las áreas A (Fig. 6.9), de esta manera tener un contraste que permita diferenciar las líneas blancas de las negras. No obstante, a medida que se decrementa el paso, la resolución va mejorando hasta alcanzar la resolución óptima. Esta resolución óptima es la que limita al sistema de captación ya que por muy fino que se quiera hacer el paso no se obtendrá una mejor resolución ya que para obtener la imagen no solo depende del paso del motor sino también del área de captura y llegará un punto donde el área de B sea igual al área de A siendo el blanco y el negro indistinguibles.



FIGURA 6.9: Ejemplo de región de captura (spot) capturando simultáneamente regiones negras (A) y blanca (B).

Para el sistema de captación con fibra, se capturó a una distancia de 1.2 cm respecto a la muestra con un diámetro de spot de 4.5 mm (Fig. 6.10).

Para la captura con paso igual al diámetro del área de captación, no se distingue prácticamente nada, excepto el cuadrado negro. Si se observa con detenimiento, se puede ver que hay dos patrones en el elemento 1 del grupo -2, pero no se distingue las líneas, esto es debido a que el paso es demasiado grande.

Para poder distinguir estos patrones, se volvió hacer la misma captura pero esta vez con un paso de 0.9 mm (20 % del diámetro del área de captación), de esta manera se empezó a distinguir patrones de distintos elementos quedando limitada por el elemento 4 del grupo -2. Por tanto, la resolución (lp/mm) para este sistema es de 2.6939 lp/mm.



FIGURA 6.10: Captación de las capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 para el sistema de captación con fibra. Izquierda, captación con un paso igual al diámetro de spot. Derecha, captación con un paso al 20 % del diámetro de spot.

Para el sistema con colimador, el diámetro del área de captación mínima que se obtuvo fue de 4 mm (Fig. 6.11). En la primera captura de este sistema con un paso de 4 mm no se distingue los patrones de los elementos, excepto el cuadro negro. Se hizo una segunda captura con un paso de 0.8 mm (20 % del diámetro del área de captación), mejorando al sistema de captación con fibra, ya que el último elemento que se puede distinguir es el 5 del grupo -2. Por tanto, la resolución (lp/mm) para este sistema es de 2.4000 lp/mm.



FIGURA 6.11: Captación de las capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 para el sistema de captación con colimador. Izquierda, captación con un paso igual al diámetro de spot. Derecha, captación con un paso al 20 % del diámetro de spot.

El siguiente sistema de captación es la combinación de la lente biconvexa con la fibra. La mejor focalización se obtuvo a una distancia de 10.2 cm con un diámetro de spot igual a la de la fibra, 4.5 mm (Fig. 6.12). Hay que tener en cuenta que el área de captación de la fibra sobre la lente tiene que ser menor al diámetro de la lente biconvexa.



FIGURA 6.12: Captación de las capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 para el sistema de captación con lente biconvexa. Izquierda, captación con un paso igual al diámetro de spot. Derecha, captación con un paso al 20 % del diámetro de spot.

Por tanto, para esta medida se eligió un diámetro del área de spot de 5 mm a una distancia de 9 cm aproximadamente. Para la primera captura con paso igual al diámetro de spot pasa lo mismo que en los dos sistemas anteriores, mientras que con un paso de 1 mm (20% del diámetro de spot) el resultado fue peor que los sistemas anteriores. Su resolución fue de 3.8098 lp/mm.

Por último, el sistema de captación de la lente biconvexa con el colimador tiene una resolución mucho mejor que todos los sistemas anteriores (Fig. 6.13).

La primera captura se realizó con un paso de 1 mm a una distancia de 5 cm, que a simple vista los detalles de la imagen es mucho mejor. Es curioso ver que cuesta un poco más distinguir los patrones del elemento 6 del grupo -2 que el elemento 1 del grupo -1, así que la resolución la da este ultimo elemento, con 1.9049 lp/mm.

Para la segunda captura, el paso que se eligió fue de 0.3 mm (30 % del diámetro del área de captura) debido a que el tiempo de cómputo era demasiado grande y por eso también se tuvo que reducir el área de la imagen a capturar. La resolución de este sistema supera a todos los demás, llegando a distinguir el elemento 1 del grupo 0, con una resolución de 0.9524 lp/mm.



FIGURA 6.13: Captación de las capas 2 y 3 de la carta de USAF 1951 para el sistema de captación con lente biconvexa y colimador. Izquierda, captación con un paso igual al diámetro de spot. Derecha, captación con un paso al 30% del diámetro de spot.

# 6.2. Medida de la muestra biológica

Las medidas realizadas se clasifican en tres objetivos: el análisis espectral simple, representación de los espectros a una lambda determinada (multiespectral) y la reconstrucción de color de la muestra capturada mediante sus espectros.



FIGURA 6.14: Fotografía de la captura de carne picada.

#### 6.2.1. Análisis espectral simple

En primer lugar se toman las medidas y se analizan los espectros de la muestra.

Para cada punto muestreado mediante el barrido de los ejes x e y, se obtiene el espectro de la muestra en ese lugar concreto. Cuando el tamaño del spot de captura es suficiente pequeño, se pueden identificar con suficiente precisión diferentes zonas en la muestra. En la figura 6.15 se puede ver una fotografía de la muestra utilizada para la captura con una rejilla superpuesta, indicando los puntos donde se han tomada medidas, a modo de pixel. Si bien cada pixel sería de forma circular, correspiente con el spot de captura, la rejilla se ha dibujado en cuadrados por facilidad.

Conociendo la posición de cada medida en la imagen original, se puede relacionar la posición la fotografía de la muestra con el espectro medido en cada posición, y de esta forma conocer el espectro de las diferentes regiones, en este caso carne, puntos de grasa o perejil y papel utilizado como envoltorio (Fig. 6.16). A partir de cada espectro, se pueden aislar componentes con picos característicos, como es el caso de la hemoglobina en la región de 530-560nm.



FIGURA 6.15: Imagen del tejido (centro) y sus espectros en los puntos señalados alrededor de la muestra. Los espectros han sido corregidos en reflexión y se encuentran en el rango de 450 a $850~\rm{nm}.$ 



FIGURA 6.16: Espectros de la carne picada, grasa y perejil.

#### 6.2.2. Análisis multiespectral

Puesto que en cada punto medido se tiene el espectro con una alta resolución espectral, el resultado conjunto se trata de una medida multiespectral de la muestra, obtenida al añadir dos ejes longitudinales y un eje espectral. Esto permite obtener otro tipo de resultados, como puede ser la obtención de imágenes a longitudes de onda relevantes, como puede ser la hemoglobina. Estas imágenes representan un mapa de concentración relativa debido a picos de absorción a longitudes de onda específicas en cada componente. En la figura 6.17 se muestran 3 mapas de concentración de diferentes sustancias, obtenidos al representar sendas longitudes de onda concreta. A saber, para la hemoglobina oxigenada  $\lambda = 542 nm$ , para la desoxigenada  $\lambda = 550 nm$  y para la grasa lambda = 630 nm.



FIGURA 6.17: Espectros a una  $\lambda$  determinada. Arriba a la izquierda,  $\lambda = 542 nm$  y a la derecha,  $\lambda = 550 nm$ . Abajo a la izquierda,  $\lambda = 630 nm$  y a la derecha, fotografía del trozo de carne picada.

Se puede apreciar en la figura 6.17, mediante la comparativa visual con la imagen de hamburguesa, como la zona de carne tiene alto contenido en hemoglobina, tanto oxigenada como no oxigenada. Y así mismo, se pueden diferenciar las regiones de grasa en la zona de carne picada. Una vez obtenido la medida multiespectral, también se pueden aplicar procesados más complejos que permitan manejar no solo picos espectrales, sino regiones espectrales. Este tipo de procesados se quedan fuera del alcance del presente proyecto fin de carrera.

#### 6.2.3. Reconstrucción de color

#### 6.2.3.1. Espacios de representación de color CIE XYZ 1931

El objetivo de un modelo de color es facilitar las especificaciones de los colores de una forma normalizada y aceptada genéricamente; es la especificación de una sistema de coordenadas tridimensionales y de un subespacio de este sistema en el que cada color queda representado por un único punto.

CIE es la Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale de l'éclairage) es la autoridad internacional en cuestiones de luz, iluminación, color y espacios de color.

En 1931, con base en los resultados de la versión CIE RGB del ojo humano, CIE determina matemáticamente un espacio de color llamado el espacio de color CIE XYZ 1931.



FIGURA 6.18: Diagrama de cromaticidad según CIE 1931 [65].

En la figura 6.18<sup>1</sup>, el área de color es el espacio de color CIE XYZ 1931. Esta zona es el límite matemático de la visión humana en lo que se refiere a color. Como se puede ver, el espacio total del color del ojo humano es mayor que los resultados experimentales de CIE RGB.

El sistema de color XYZ no es RGB. X, Y y Z son extrapolaciones de RGB creados matemáticamente para evitar números negativos. Y significa luminancia, Z es un tanto igual a azul, y X es una mezcla con la curva de sensibilidad del rojo.

La cromaticidad de un color se determina a través de dos parámetros derivados x e y, que vienen de la normalización de los valores primarios X,Y y Z. Tales valores primarios tienen las siguientes propiedades:

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Importante: El diagrama de cromaticidad tiene un aspecto bidimensional pero en realidad es tridimensional.



FIGURA 6.19: Primarios XYZ usando coordenadas cromáticas [65].

Siempre producen un valor triestímulo positivo. Se puede representar cualquier color en los términos de estas primarias.

Están relacionadas con la sensibilidad del ojo humano por el uso de funciones de igualación ("Color Matching Functions") que se corresponde con el observador estándar según el CIE 1931.

Si la distribución de la respuesta espectral de un objeto de color se pondera por las siguientes curvas, que son las funciones de igualación antedichas, se pueden calcular las coordenadas de cromaticidad XYZ.



FIGURA 6.20: Funciones de igualación según el observador estándar en CIE 1931 [66].

Para pasar del espacio de color XYZ a RGB se utiliza la siguiente matriz:

$$\begin{bmatrix} 0,4185 & -0,1587 & -0,0828 \\ -0,0912 & 0,2524 & 0,0157 \\ 0,0009 & -0,0025 & 5,1786 \end{bmatrix}$$



FIGURA 6.21: Esquema gráfico para la obtención de XYZ [67].

Debido a características inherentes del ojo humano y la teoría tricrómatica, todos los colores que pueden ser reconocidos en una imagen son combinaciones de aquellos llamados colores primarios Rojo (R), Verde (G) y Azul (B).



FIGURA 6.22: Representación de colores primarios [66].

El modelo RGB es uno de los más utilizados. En él que cada color aparece en sus componentes espectrales primarias RGB y esta basado en el sistema de coordenadas cartesianas. El subespacio de color es el tetraedro mostrado en la figura 6.23.

Por norma general, se asume que todos los vectores han sido normalizados, de modo que el tetraedro es unitario estando los valores de RGB en el rango [0,1].



FIGURA 6.23: Tetraedro del sistema RGB basado en coordenadas cartesianas (8 bits) [66].

Las imágenes constituidas en el espacio de color RGB son el resultado de la suma de los tres planos de imagen independientes, constituidos cada uno de ellos por el nivel de cada uno de los colores primarios RGB.

#### 6.2.3.2. Resultados

Según se ha visto en la sección anterior, la imagen percibida por el ojo es una combinación ponderada de una forma precisa de longitudes de onda en la región visible del espectro. Por tanto, al disponer de la medida multiespectral de la muestra, se puede obtener una representación en el espacio XYZ y a través ésta, se puede obtener una representación en RGB para ser visualizada (Fig. 6.24).



FIGURA 6.24: Izquierda, fotografía de la muestra capturada. Derecha, reconstrucción de color de la muestra con CIE 1931.

La principal ventaja de esta representación es que se puede conocer con exactitud la región de la muestra que ha producido ese espectro en concreto. En el caso de la figura 6.17, se ha tomado una fotografía y se ha dibujado una rejilla superpuesta, obteniendo una buena correlación pero no perfecta de las regiones medidas en casa punto. En el caso de las CMF la correlación es absoluta puesto que procede del mismo dato de origen, y en caso de haber mezcla de regiones en una misma medida, el color producido por las CMF será una combinación lineal de ambas.
### Capítulo 7

## Conclusiones y líneas futuras

#### 7.1. Conclusiones

El objetivo del proyecto es el estudio de componentes ópticos, diseño, desarrollo y puesta en funcionamiento de un sistema de medida de reflectancia difusa de aplicación en muestras biológicas u otras muestras, capturando los espectros de la muestra sin contacto con el sistema de captación utilizado. Con este fin, se ha ido avanzando en función de distintos resultados.

- En primer lugar se ha diseñado un sistema sencillo que permite medir la reflexión difusa de las muestras. Después se ha optimizado y automatizado la adquisición de la medida y su análisis mediante un control centralizado en Matlab. Esto ha permitido tener de forma precisa el espectro en cada punto de la muestra y hacer un mapa espectral de ésta.
- En segundo lugar, con la intención de mejorar el sistema de medida, se han analizado cuatro sistemas de captación en cuanto a tamaño de spot, prestaciones óptica (contraste y resolución) y de imagen para compararlos entre ellos y elegir el mejor sistema de captación.

La medida del tamaño del diámetro del spot de captación de luz se realizo mediante técnicas de reflexión difusa para cada uno de los sistemas. De esta forma, se puede estimar el área de captación de una forma valida con distintos sistemas de focalización.

La ventaja de éste método es que permite medir el diámetro del spot de captura con distintos montajes y elementos focalizadores, sin necesidad de mantener unas condiciones determinadas, como distancia a la muestra, ángulo de inclinación, etc. puesto que la medida se basa en la energía recibida.

• Se ha desarrollado una herramienta de control de medidas automatizada y de análisis, que cuenta con una interfaz gráfica para facilitar su uso.

 Por último, se realizó una captura de un trozo de hamburguesa a modo de ejemplo de aplicación y prueba de viabilidad con el mejor sistema de captación para su análisis y reconstrucción de imagen a partir de los espectros capturado.

#### 7.2. Líneas futuras

Los resultados obtenidos indican que si se puede determinar la composición de una muestra mediante la medida de la reflexión difusa y sin necesidad de contacto y que además se puede reconstruir la muestra capturada y analizar todos los espectros a una lambda determinada.

Sin embargo, hay diferentes líneas de mejora:

- En el caso de muestras biológicas, es necesario utilizar sería interesante encontrar una fuente fría a poder ser para que no perjudique las características de la muestra y que a su vez reduzca el tiempo de integración del espectrómetro.
- El sistema con mejor prestación fue la combinación de la lente biconvexa con el colimador con un diámetro de spot de 1 mm. Esta óptica se puede mejorar con elementos ópticos más potentes, como sistemas con varias lentes para microscopia. Sin embargo, un tamaño muy reducido implica una menor captación de luz, y por tanto un tiempo de integración elevado.
- En cuanto al montaje, el rango espectral de medida está dominado por el espectro de absorción de la hemoglobina. Si se extiende el rango de medida hasta la zona de 1600 nm, donde tanto la grasa como el agua tienen unos picos de absorción mayores, se podrán detectar mejor otras componentes y medir sus concentraciones, para ello tendríamos que reemplazar el espectrómetro por uno con mayor rango espectral.
- Por último, se puede optimizar el código sobretodo en el análisis de las muestras así como algunos controles de flujo de error para la interfaz.

# Bibliografía

- Thomas Edison. URL http://www.ronniearias.com/nacio-de-mi/compendio-boludeces/luz\_31590.html.
- [2] La bombilla incandescente. URL http://www.elmundo.es/elmundo/2012/08/31/ciencia/1346441405.html1.
- [3] Gillian Pocock and Christopher D Richards. Fisiología humana: la base de la medicina. Masson, 2002.
- [4] Espectro electromagnético. URL https://es.wikipedia.org/wiki/Espectro\_electromagnético.
- [5] Mohamed Fadhali. Advanced photonic sciences. 2012.
- [6] Bios Therapy. URL http://www.drwilsam.com/2013/08/bios-therapy.html.
- [7] Tuan Vo-Dinh. Biomedical Photonics Handbook: Biomedical Diagnostics, volume 2. CRC press, 2014.
- [8] Elke Sattler, Raphaela Kästle, and Julia Welzel. Optical coherence tomography in dermatology. *Journal of biomedical optics*, 18(6):061224-061224, 2013.
- [9] S.A 1.3 Curso de Verano. Nuevas tecnologías en la salud de la piel. 2014.
- [10] Haihong Zhang, Shujuan Zhang, Fenghua Wang, and Dengfei Jie. Research on the firmness of persimmon by near\_infrared diffuse reflectance spectroscopy. In World Automation Congress (WAC), 2010, pages 455–459. IEEE, 2010.
- [11] Ishizawa Hiroaki, Takeuchi Masahiko, Nishimatsu Toyonori, and Toba Eiji. Diffuse reflectance near-infrared spectral image measurement for the field monitoring of agricultural products. In Instrumentation and Measurement Technology Conference, 2002. IMTC/2002. Proceedings of the 19th IEEE, volume 1, pages 3-6. IEEE, 2002.
- [12] Bo Cai, Huacai Chen, Yongjun Zhang, and Jiaxin Jiang. Non-destructive determination of the quality components in fresh pork meat using near diffuse reflectance spectroscopy. In *Photonics and Optoelectronic (SOPO), 2010 Symposium on*, pages 1–4. IEEE, 2010.

- [13] Judith R Mourant, Irving J Bigio, James Boyer, Richard L Conn, Tamara Johnson, and Tsutomu Shimada. Spectroscopic diagnosis of bladder cancer with elastic light scattering. Lasers in surgery and medicine, 17(4):350-357, 1995.
- [14] Irving J Bigio and Judith R Mourant. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. *Physics in medicine and biology*, 42(5):803, 1997.
- [15] George Zonios, Lev T Perelman, Vadim Backman, Ramasamy Manoharan, Maryann Fitzmaurice, Jacques Van Dam, and Michael S Feld. Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps in vivo. Applied Optics, 38(31):6628-6637, 1999.
- [16] Urs Utzinger, Molly Brewer, Elvio Silva, David Gershenson, Robert C Blast, Michele Follen, and Rebecca Richards-Kortum. Reflectance spectroscopy for in vivo characterization of ovarian tissue. Lasers in surgery and medicine, 28(1):56–66, 2001.
- [17] Yvette N Mirabal, Sung K Chang, Edward Neely Atkinson, Anais Malpica, Michele Follen, and Rebecca Richards-Kortum. Reflectance spectroscopy for in vivo detection of cervical precancer. Journal of biomedical optics, 7(4):587–594, 2002.
- [18] JJ Scarisbrick, CDO Pickard, Andrew C Lee, Gavin M Briggs, Kristie Johnson, Stephen G Bown, Marco Novelli, MRS Keshtgar, Irving J Bigio, and R Yu. Elastic scattering spectroscopy in the diagnosis of pigmented lesions: comparison with clinical and histopathological diagnosis. In *European Conference on Biomedical Optics 2003*, pages 147–156. International Society for Optics and Photonics, 2003.
- [19] Shanthi Prince and S Malarvizhi. Analysis of diffuse reflectance spectra of various skin conditions by principal component method. In *Biomedical and Pharmaceutical Engineering*, 2009. ICBPE'09. International Conference on, pages 1–4. IEEE, 2009.
- [20] Lanzan iKnife, un cuchillo que detecta el cáncer. URL http://www.buendiario.com/lanzan-iknife-un-cuchillo-que-detecta-el-cancer/.
- [21] Sonda de reflexión: 6 alrededor de 1. URL http://oceanoptics.com/?attachment\_id=2288.
- [22] Rami Nachabé, Benno HW Hendriks, Marjolein van der Voort, Adrien E Desjardins, and Henricus JCM Sterenborg. Estimation of biological chromophores using diffuse optical spectroscopy: benefit of extending the uv-vis wavelength range to include 1000 to 1600 nm. *Biomedical optics express*, 1(5):1432–1442, 2010.
- [23] Werner Schmidt. Optical spectroscopy in chemistry and life sciences: an introduction. Wiley-VCH, 2005.

- [24] Aplicación del colorimetría para corrección de imágenes, URL http://dspace.sheol. uniovi.es/dspace/bitstream/10651/31528/6/TFMAndresGarciaCorbatoRUO.pdf.
- [25] Propiedades ópticas de la materia. URL http://www.ehu.eus/alfredomartinezargote/ tema\_4\_archivos/luminotecnia/03.%20Propiedades%20de%20la%20materia.pdf.
- [26] Christian Raulin and Syrus Karsai. Laser and IPL Technology in Dermatology and aesthetic Medicine. Springer Science & Business Media, 2011.
- [27] Eugene Hecht and A Zajac. Optics, chapter 9, 2002.
- [28] Markolf H Niemz. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. Springer Science & Business Media, 2013.
- [29] Eusebio Real Peña et al. Identificación de la composición de tejidos biológicos a partir de medidas de reflectancia difusa. 2012.
- [30] Valeriĭ Viktorovich Tuchin and V Tuchin. *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis*, volume 13. SPIE press Bellingham, 2007.
- [31] B Morales Cruzado, S Vázquez y Montiel, et al. Obtención de los parámetros ópticos de la piel usando algoritmos genéticos y mcml. Revista mexicana de física, 57(004), 2011.
- [32] Valery V Tuchin. Handbook of photonics for biomedical science. CRC Press, 2010.
- [33] Tissue Optics. URL http: //www.guidedinc.com/wp-content/uploads/2014/09/Jacques\_Sweden2009\_1st.pdf.
- [34] Alejandro De la Cadena Pérez-Gallardo. Estudio de la reflexión Óptica difusa en tejido biológico. Master's thesis, Instituro Politécnico Nacional de México, 2012.
- [35] David Hattery, Brenda Hattery, Victor Chernomordik, Paul Smith, Murray Loew, James Mulshine, and Amir Gandjbakhche. Differential oblique angle spectroscopy of the oral epithelium. Journal of biomedical optics, 9(5):951–960, 2004.
- [36] Ashley J Welch and Martin JC Van Gemert. Optical-thermal response of laser-irradiated tissue, volume 1. Springer, 1995.
- [37] Espectrómetros. URL http://www.espectrometria.com/espectrmetros.
- [38] Espectrómetro HR2000 / HR2000CG-UV-NIR . URL http://oceanoptics.com/wp-content/uploads/hr2000.pdf.
- [39] Detector SONY-ILX511B. URL http://oceanoptics.com/wp-content/uploads/SONY-ILX511B.pdf.

- [40] USB2000+ Fiber Optic Spectrometer. URL http: //oceanoptics.com/wp-content/uploads/USB2000-Operating-Instructions1.pdf.
- [41] Controladora SMC Pollux. URL http://www.promsnab.info/catalogues/micos/motion%20control%20vol9.pdf.
- [42] Motor VT-80. URL http://www.pimicos.com/web2/en/1,4,210,vt80.html.
- [43] DC950 Illuminator. URL http://www.dolan-jenner.com/Manuals/DC950\_manual.pdf.
- [44] Fibras Ópticas Sencillas Grado Laboratorio, URL http://www.insolab.com.co/ catalogo/product/194-fibras-opticas-sencillas-grado-laboratorio.
- [45] Fibers and Probes, URL http://oceanoptics.com/wp-content/uploads/Ocean\_Optics\_Fibers\_Probes.pdf.
- [46] Fibra P300-1-SR, . URL http://oceanoptics.com/?attachment\_id=3851.
- [47] Apertura Numérica. URL https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Optic\_fibre-numerical\_aperture\_diagram.svg.
- [48] N-BK7 Bi-Convex Lens. URL http://search.newport.com/?q=\*&x2=sku&q2=KBX046.
- [49] Fixed Lens Mounts. URL http://www.thorlabs.de/newgrouppage9.cfm?objectgroup\_id=1433&pn=LMR1/M#4979.
- [50] Fixed Focus Collimation Packages: SMA905 Connectors, . URL http://www.thorlabs.us/newgrouppage9.cfm?objectgroup\_id=355.
- [51] Estándares de reflectancia. URL http://www.acalbfi.com/es/Fotonica/ Espectroscopia/Estandares-de-Reflectancia-y-Materiales/p/ Estandares-de-reflectancia/0000001W4X.
- [52] Reflectance Materials and Coatings. URL https://www.labsphere.com/wp-content/ uploads/2015/02/a-guide-to-reflectance-materials-and-coatings.pdf.
- [53] Función de distribución. URL https://es.wikipedia.org/wiki/Funci%C3%B3n\_de\_distribuci%C3%B3n.
- [54] Distribución de probabilidades. URL http://metodoscuantitativo2.galeon.com/enlaces2218784.html.
- [55] Distancia focal de una lente convergente. URL http://opticaporlacara.com/2012/03/bricoptica-telescopio-refractor-casero/.
- [56] Matlab: El lenguaje de cálculo técnico. URL http://es.mathworks.com/products/matlab/.

- [57] Usando Guide, . URL http: //catarina.udlap.mx/u\_dl\_a/tales/documentos/lep/garcia\_b\_s/capitulo3.pdf.
- [58] Manual de Interfaz Gráfica de Usuario en Matlab, URL https://www.dspace.espol. edu.ec/bitstream/123456789/10740/19/%255Bmatlab%255D\_MATLAB\_GUIDE.pdf.
- [59] Aprende a evaluar un objetivo: Te contamos cómo funcionan las curvas MTF. URL http://www.xatakafoto.com/guias/ aprende-a-evaluar-un-objetivo-te-contamos-como-funcionan-las-curvas-mtf-i.
- [60] Choosing the Correct Test Target. URL http://www.edmundoptics.com/technical-resources-center/testing-targets/ choosing-the-correct-test-target/.
- [61] Tamaño y resolución de una imagen. URL http://www.tuinstitutoonline.es/cursos/gimp\_2\_8/05tamano\_resolucion.php.
- [62] Introduction to Modulation Transfer Function. URL http://www.edmundoptics.com/ technical-resources-center/optics/modulation-transfer-function/.
- [63] Carta de pruebas USAF 1951, URL https://en.wikipedia.org/wiki/1951\_USAF\_resolution\_test\_chart.
- [64] USAF 1951 and Microcopy Resolution Test Charts and Pixel Profiles , URL http://www.efg2.com/Lab/ImageProcessing/TestTargets/#USAF1951.
- [65] ¿Cuál es la diferencia entre CIE LAB, CIE RGB, CIE xyY y CIE XYZ?, URL http://wolfcrow.com/blog/ what-is-the-difference-between-cie-lab-cie-rgb-cie-xyy-and-cie-xyz/.
- [66] Aplicación de colorimetría para corrección de imágenes, URL http://dspace.sheol. uniovi.es/dspace/bitstream/10651/31528/6/TFMAndresGarciaCorbatoRUO.pdf.
- [67] Espacios de representación del color, URL http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/15072/3/Tema\_03\_CColor.pdf.