

MICROSCOPIO FOTOACÚSTICO DE ALTA RESOLUCIÓN BASADO EN DIODO LÁSER DE BAJO COSTE Y SONDA LINEAL DE ULTRASONIDOS

PACS: 43.35.Ud, 43.35.Sx, 43.35.Yb

J. A. Navarro-Calvo, J. J. García-Garrigós, A. Cebrecos, F. Camarena

Instituto de Instrumentación para Imagen Molecular (i3M), CSIC - Universitat Politècnica de València (UPV), Camino de Vera S/N, 46022, València, Spain. jgarcia@i3m.upv.es

Palabras Clave: microscopía fotoacústica de resolución óptica, ORPAM, ultrasonidos, diodo láser, PLD, transductor lineal *phased array*

ABSTRACT

Photoacoustics (PA) is an emerging biomedical imaging modality that exploits the eponym physical effect consisting in the detection of ultrasound waves that arise inside biological tissues when are illuminated with laser beams. It provides a functional imaging capability by optical absorption contrast at different wavelengths of tissue substances. In this work we present an optical resolution photoacoustic microscopy (ORPAM) system based on an infrared pulsed laser diode (PLD) and an ultrasound linear array probe. Both the probe and the laser objective are mounted together in the system head structure, so that PA images can be acquired in reflection mode by raster scanning the sample from above. Which is the best configuration for future clinical imaging applications. PLDs are a very promising alternative to Q-switched solid-state lasers for ORPAM systems, where the required laser pulse energy is less demanding. A beam shaping and homogenization method based on coupling the PLD to a squared optical fiber is used in our system to enhance the PA microscope resolution. Experimental photoacoustic images obtained with this method demonstrate a lateral resolution under 75 microns and at a centimeter-long laser focusing distance, unmet by similar PLD-based ORPAM systems in reflection confocal mode.

RESUMEN

La fotoacústica (PA) es una modalidad emergente de imagen biomédica que explota el efecto físico epónimo consistente en la detección de ondas de ultrasonido que surgen en el interior de los tejidos biológicos cuando son iluminados con haces láser. La capacidad de imagen funcional en tejido biológico se obtiene mediante el contraste de absorción óptica a diferentes longitudes de onda. En este trabajo presentamos un sistema de microscopía fotoacústica de resolución óptica (ORPAM, de su acrónimo en inglés) basado en diodo láser pulsado infrarrojo (PLD) y transductor de ultrasonidos (US) de tipo lineal *phased-array*. Tanto la sonda como el objetivo láser se montan en el cabezal del sistema, de modo que las imágenes PA pueden adquirirse en modo reflexión mediante el escaneo de la muestra desde arriba, en una configuración adecuada para futuras aplicaciones clínicas. Los PLD son una alternativa muy prometedora, de muy bajo coste y compacta comparada con los láseres de estado sólido tipo *Q-switched*. Sobre todo, para sistemas ORPAM donde no se requiere demasiada energía láser. En nuestro sistema se utiliza un método de conformación y homogeneización del haz basado en el acoplamiento del PLD a una fibra óptica cuadrada, para así mejorar la resolución del microscopio PA. Las imágenes fotoacústicas se han conseguido a resoluciones menores de 75 μm y a un centímetro de focalización láser, sin precedentes en microscopios ORPAM basados en PLDs y en modo confocal de reflexión.

1. INTRODUCCIÓN

En los sistemas de imagen fotoacústica (PA) es habitual elegir láseres de estado sólido (SSL), de tipo *Q-switched*, como por ejemplo *Nd:YAG*, como fuente de excitación óptica debido a su elevado rendimiento para producir haces pulsados de nanosegundos, con alta energía y alta calidad. Estos haces gaussianos están cerca del límite de difracción, lo que significa que pueden enfocarse fácilmente en los menores tamaños de punto focal, además con largas distancias focales y bajas pérdidas de energía. Ejemplos de estos sistemas de microscopía fotoacústica (PAM), normalmente utilizan lentes ópticas simples, objetivos de microscopio complejos y fibras ópticas monomodo o multimodo, como los que se describen en [1], [2]. Sin embargo, su elevado coste y su voluminoso tamaño han fomentado el uso de diodos láser pulsados (PLD) como una alternativa viable para la microscopía fotoacústica de resolución óptica (ORPAM). En esta modalidad de imagen, el haz láser se enfoca en un tamaño de *spot* pequeño, el cual, esencialmente, define la resolución lateral, y requiere menos energía láser por pulso (unos pocos microjulios) para producir ondas PA detectables por transductores de ultrasonidos convencionales. Los PLD son aproximadamente cien veces más baratos y también pueden alcanzar mayores tasas de repetición de pulsos por encima de los 10 kHz, en comparación con los SSL. Como contrapartida, los haces de los PLD son mucho más difíciles de enfocar, en tamaños de *spot* pequeños y uniformes, que los haces gaussianos puros. Esto se debe, principalmente, a la gran área de emisión de los PLD, y sus patrones de emisión irregulares y divergencias elípticas amplias, lo cual limita la resolución lateral del sistema y la calidad de la imagen PA final. Para obtener puntos focales láser más pequeños, es habitual utilizar lentes de alta apertura numérica (NA) y longitudes focales cortas, o también, objetivos de microscopio más complejos y costosos. Estos tipos de configuraciones ópticas consiguen buenas resoluciones laterales, aunque a costa de disminuir la distancia de trabajo, o focalización, del láser (WD) a unos pocos milímetros [3], [4]. Esto limita mucho el espacio libre destinado a los transductores o reflectores de ultrasonidos para recibir los frentes de onda en modo confocal de reflexión.

Hasta ahora se han propuesto dos estrategias ópticas interesantes con este objetivo. El primer sistema utiliza un potente PLD de 350 W y un transductor focalizado en modo de transmisión, donde la óptica del haz se compone de varias lentes cilíndricas, para así preparar el haz para el escaneo láser con espejos galvanométricos y una lente esférica final con WD de alrededor de 1 cm, y con una resolución lateral de 21 μm [5]. Un sistema más reciente [6] se basa en un diodo láser visible de 2 W enfocado con un objetivo de espejo reflectante y una lente esférica sencilla. En este trabajo se afirma haber conseguido 2,2 cm de WD y 10 μm de resolución lateral, también con un transductor de un mono-elemento y en modo de transmisión.

En este trabajo se propone una nueva estrategia para mejorar la resolución lateral manteniendo una WD de un centímetro de longitud, por lo que puede ser una solución adecuada para trabajar en modo confocal de reflexión para sistemas ORPAM basados en PLDs de bajo coste, como se requiere para aplicaciones clínicas. La configuración óptica se basa en acoplar la potencia del haz del PLD a una fibra óptica multimodo de gran apertura numérica (NA) y núcleo cuadrado, donde el haz transmitido por la fibra se homogeneiza muy bien y adquiere la forma transversal cuadrada de su núcleo a su salida. De este modo, la fibra actúa como una fuente láser secundaria, que ahora tiene el tamaño y la forma del núcleo de la fibra, un perfil de fluencia (energía por unidad de superficie) plano, y además, con divergencias horizontales y verticales igualadas. A continuación, el haz se entrega al punto de excitación láser final mediante una óptica de imagen adecuada para obtener un tamaño de punto focal proporcional al núcleo de la fibra. Adicionalmente, se consigue una mayor resolución lateral colocando una apertura *pinhole* justo a la salida de la fibra, como un filtro espacial que reduce el punto focal final sin reducir su fluencia, aunque con menos energía láser. Con el fin de evaluar su rendimiento de imagen fotoacústica en un blanco de resolución de prueba (USAF-1951), se ha diseñado y construido un sistema ORPAM experimental con esta óptica de haz y un transductor lineal *phased array* convencional en modo confocal de reflexión y con dos resoluciones laterales disponibles.

2. MÉTODOS Y MATERIALES

2.1. Descripción del microscopio fotoacústico ORPAM

El diseño de este sistema de ORPAM se muestra en el esquema de la Figura 1. La fuente láser PLD elegida (905D3S3J08X, Laser Components, Alemania) tiene una longitud de onda de emisión de 905 nm con una potencia de pulso nominal de 195-W, y produciendo pulsos de 100 ns de duración de frecuencia de repetición (PRF) de hasta 10 kHz. Este se compone de 3 barras de 3 diodos láser más pequeños apilados verticalmente con un área de emisión global de $200 \times 220 \mu\text{m}^2$ y divergencias de haz de 25° y 10° (a mitad de su perfil de intensidad), para los ejes x e y , llamados ejes lento y rápido, respectivamente. La primera etapa de acoplamiento de la fibra consiste en un par de lentes esféricas plano-convexas (ACL2520U-B, ACL1210U-B, Thorlabs, EE.UU.), en una configuración común de colimación-enfoque que proporciona un factor de aumento de alrededor de 0.5. Esta óptica lanza el haz a la entrada de una fibra óptica de núcleo cuadrado de $150 \mu\text{m}$, construida con un cable de 2-m de longitud terminado con conectores SMA905 (M97L02, Thorlabs). Para maximizar la potencia del haz acoplado a la fibra, se utiliza una montura de desplazamiento micrométrico (CXY1A, Thorlabs) para alinear con precisión la posición de la fibra mediante dos tornillos de ajuste x e y . La última etapa óptica tiene el mismo factor de aumento que la primera, y proporciona un haz casi plano a la salida de la fibra hasta el punto focal final, con la mitad del tamaño del núcleo cuadrado de la misma, de $75 \mu\text{m}$ de lado. Esta configuración corresponde al modo de resolución normal del sistema. Para el modo de alta resolución, una lámina de Aluminio de $10 \mu\text{m}$ de grosor con un orificio de $20 \mu\text{m}$ de apertura (Edmund Optics, 52-869) se centra justo delante de la cara de salida de la fibra para obtener así un foco de punto focal láser de aproximadamente $10 \mu\text{m}$. Por último, los frentes de onda acústicos generados por los disparos del láser sobre la muestra son recibidos por un transductor de ultrasonidos de matriz lineal (L11-5v) de 7,6-MHz de frecuencia central y 128 elementos piezoeléctricos, el cual está conectado a la plataforma de adquisición de ultrasonidos Vantage 256™ (Verasonics, EE.UU.), donde todos los eventos de control y secuencias de adquisición pueden ser programados en código Matlab.

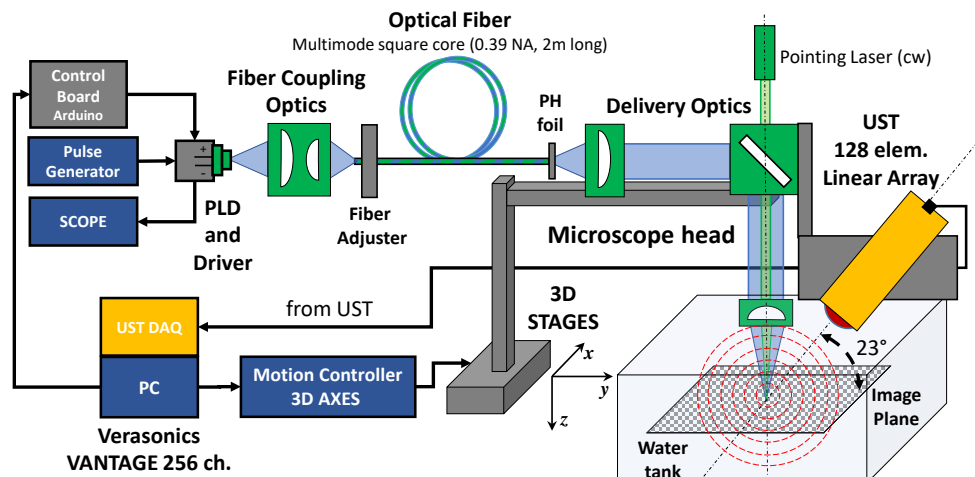


Figura 1 – Esquema del microscopio ORPAM con el haz láser y el transductor lineal de ultrasonidos (UST) en modo reflexión confocal. La estructura del cabezal del microscopio, conectado al final de la fibra óptica, se ha colocado en los ejes de movimiento 3D para el escaneo de la muestra en el plano imagen, sumergida en un tanque de agua.

El sistema ORPAM está configurado en modo confocal de reflexión, de modo que la sonda de ultrasonidos y la óptica de focalización del láser se mantienen por encima de la muestra de imagen, constituyendo ambos la estructura del cabezal del microscopio. Gracias a la fibra óptica, conectada a los soportes ópticos de esta estructura (sistema Cage 30 mm, Thorlabs), ésta puede montarse libremente en cualquier lugar. Entre la lente colimadora de la fibra y la última lente del objetivo (ver Fig. 1), y separadas más de 10-cm, se inserta un espejo de alta reflexión para la

deflexión del haz en ángulo recto. En este mismo lugar hay espacio suficiente para emplear espejos galvanométricos, previstos para una futura implementación mediante escaneo láser de alta velocidad. La sonda lineal está unida al tubo del objetivo óptico mediante un soporte realizado por impresión 3D, que la mantiene en un ángulo de inclinación de 23° (con respecto al plano de la imagen), y a una distancia fija de 17.2 mm respecto al punto focal del láser. Para escanear el plano horizontal x-y de la imagen, el cabezal del microscopio está montado en una torre de estaciones lineales de translación en 3D de alta precisión (L-511.20DG10, PI-Physik Instrumente, Alemania), que también se utiliza para ajustar el foco del láser, a lo largo de la dirección vertical z, sobre la muestra de imagen. En la Figura 2 se muestra también una fotografía del sistema experimental actual, donde se puede ver el cabezal del microscopio (en primer plano) y parte del montaje experimental alrededor, donde la muestra sobre la que se realizará la imagen fotoacústica es un disco con los patrones de test de resolución del tipo USAF-1951 (en el recuadro), que se coloca en la plataforma porta-muestras (de color blanco), debajo del cabezal del microscopio y sumergida en un tanque de agua, empleado así como medio transmisor de las ondas ultrasónicas generadas.

Los módulos electrónicos y el equipo de este sistema ORPAM también se indican también en el esquema de la Figura 1. Se utiliza un generador de funciones arbitrarias (R&S HMF2550, Alemania) conectado al módulo controlador del PLD (LDP-V 80-100, PicoLAS, Alemania) para producir los disparos de impulsos láser, que, a su vez, se sincronizan con la ventana de tiempo de adquisición de la sonda US mediante una señal de disparo TTL enviada desde la plataforma de US Vantage. La adquisición de datos de las señales de Radio-Frecuencia (RF) de la sonda y las secuencias de movimiento del cabezal del microscopio se han programado en código Matlab, el cual se ejecuta en la computadora PC perteneciente a la misma plataforma de US Verasonics Vantage. Para todas las pruebas, la PRF del PLD se ajustó a 5 kHz y a una duración de pulso de 100 ns, con un ciclo de trabajo seguro del 0.05%, por debajo del valor máximo del 0.1%. La forma de onda del pulso láser se monitorizó continuamente con un osciloscopio (R&S RTE1154, con un ancho de banda analógico de 1,5GHz). Se utilizó una placa de control Arduino para ajustar el voltaje del banco de condensadores del controlador PLD, y por tanto la potencia óptica del PLD, hasta el nivel máximo de 65 V, al tiempo que se leían los ajustes del controlador y su temperatura de funcionamiento.

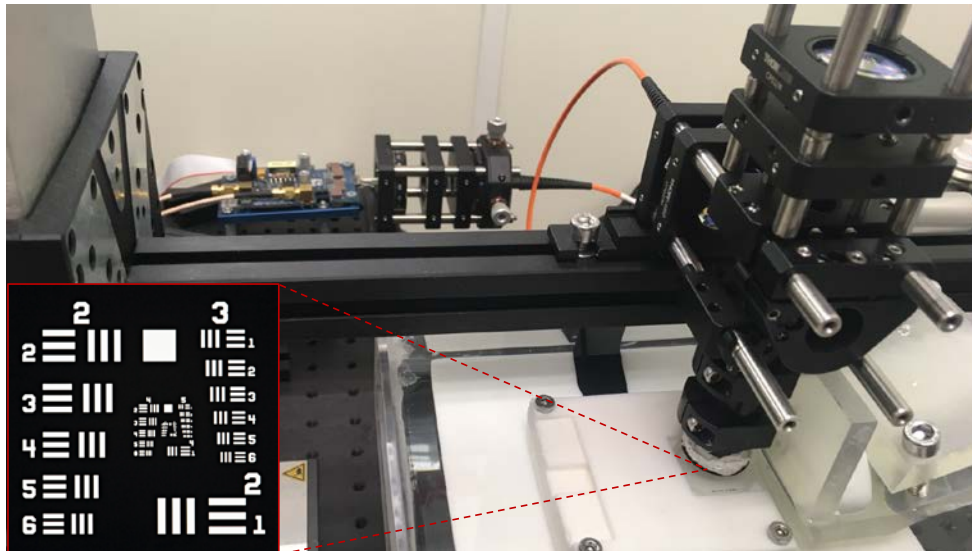


Figura 2 – Fotografía del montaje experimental del microscopio ORPAM. Al fondo, módulo electrónico del PLD y óptica de acoplamiento a fibra óptica multimodo (color naranja). En primer plano, el cabezal del microscopio con el objetivo láser y la sonda lineal de ultrasonidos sumergidos en el tanque de agua. Detalle del patrón de calibración de imagen USAF-1951.

2.2. Adquisición y procesado de imágenes fotoacústicas

El cabezal del microscopio, con el tubo del objetivo láser y la sonda lineal US en posición relativa fija, se escanea a través de los puntos del plano de imagen x - y en pasos micrométricos más cortos que el tamaño del punto focal láser, de modo que estos pasos representan los píxeles de la imagen fotoacústica final. Así pues, se realiza un conformado de haz, o *beamforming*, de foco estático mediante los 128 elementos de la sonda lineal, que actuarán de forma equivalente a un transductor focalizado monoelemento. Para obtener cada píxel de la imagen, correspondiente a la excitación puntual del láser, el frente de onda esférico recibido por la sonda de US se integra primero con el algoritmo de retardo y suma (DAS, *Delay-and-Sum*), aplicado a las señales de RF adquiridas por los 128 elementos del *array* lineal. Antes de aplicar el procesamiento DAS, las señales recibidas se promediaron para un número de disparos de láser concreto, como se especifica más adelante, con el fin de reducir el ruido eléctrico en la sonda y el sistema de adquisición de ultrasonidos. Para obtener el valor final del píxel, la señal de RF resultante del DAS, se integrará, ahora temporalmente, mediante la suma en una ventana temporal de 3 muestras de ADC (Convertidor Analógico-Digital), alrededor de la amplitud máxima del pulso de RF. Aquí se introduce pues un nuevo método denominado, proyección de máxima amplitud integrada en el tiempo (iMAP, *integration-Maximum Amplitude Projection*), en contraste con el método MAP comúnmente aplicado, en el que solo se toma la muestra del pico de señal RF. Este método es, por tanto, equivalente a medir la energía del pulso acústico, donde la relación señal/ruido (SNR) se mejora debido al promedio temporal del ruido de fondo de la señal bipolar de RF. Gracias a este método iMAP, el contraste de la imagen PA obtenida por el transductor se puede mejorar, sobretodo, para la recepción de señales acústicas débiles como las provenientes de fuentes fotoacústicas.

2.3. Caracterización óptica del haz láser

El perfil de haz y la potencia del pulso láser se midieron en varias posiciones clave del montaje de la óptica de transporte, en la superficie emisora del PLD, en los extremos de la fibra y en el punto focal final; con el fin de evaluar el rendimiento del diseño óptico antes de las pruebas de imagen PA. Se utilizó una cámara de perfil de haz CCD (LT665, Ophir Photonics, Israel) con respuesta VIS-NIR y un tamaño de píxel cuadrado de $4.54 \mu\text{m}$, para obtener las imágenes de la sección transversal del haz láser en una escala de 1-a-1, proporcionada por una lente posicionada respecto a la cámara en configuración $2f$ - $2f$.

La energía de cada pulso láser, del orden de micro-Julios, se pudieron medir con la siguiente configuración óptica: un espectrómetro-monocromador Czerny-Turner (AvaSpec-ULS2048XL-EVO), con rango espectral en el VIS-NIR y resolución de 1.5 nm, conectado por fibra óptica (FC-UVIR600-1-ME) a una esfera integradora (AvaSphere-30), donde toda la luz láser se captura en su puerto de entrada con apertura circular de 6-mm. Dicha configuración fue calibrada por el fabricante del equipo (Avantes, Países Bajos) para medir directamente el espectro de irradiancia absoluto, o la densidad espectral de potencia (en unidades de $\mu\text{W}/\text{cm}^2 \cdot \text{nm}$), para pulsos láser individuales (con una ventana de integración temporal de 10 ms y una PRF láser de 100 Hz). El espectro gaussiano característico de la emisión láser se registró para una longitud de onda central de 907 nm y un ancho de línea de 7 nm, de acuerdo con las especificaciones del PLD. La intensidad del láser por pulso se midió integrando el espectro para las longitudes de onda y, a continuación, se multiplicó por el área del puerto de entrada de luz de la esfera integradora, obteniendo de este modo la potencia del pulso láser. A partir de este valor de potencia, se obtiene una muy buena estimación de la energía del pulso láser, simplemente multiplicando por la longitud del pulso de 100 ns.

Ambos métodos sirvieron también para realizar comprobaciones durante el montaje y la alineación de la óptica del sistema, principalmente para maximizar la transmisión de potencia hasta el punto focal final del láser.

2.4. Pruebas de evaluación del microscopio ORPAM

Se realizaron varias pruebas para evaluar el rendimiento de las imágenes del sistema experimental ORPAM utilizando el patrón de test de resolución USAF-1951 (R1DS1P, Thorlabs). Éste tiene diferentes patrones de barras alternas que están agrupadas por tamaños calibrados. Dichos patrones son adecuados para obtener una buena respuesta PA, ya que están fabricados con finas capas de cromo absorbente de luz infrarroja. Para medir con precisión la resolución lateral del microscopio PA, en el plano xy de imagen, se utilizó el método de la función de dispersión de borde (ESF, *Edge Spread Function*). Este método consiste en realizar escaneos en línea del láser, con pasos más pequeños que su tamaño de *spot*, a través de un borde bien definido que separa dos regiones de alto contraste PA, es decir, una región no absorbente y otra con gran absorción de luz láser. La señal PA de cada barrido lineal sigue una curva en forma de S, que va aumentando a medida que la energía del *spot* láser entra en la región de alta absorción, de modo que puede ajustarse a una función de distribución acumulativa gaussiana (CDF, *Cumulative Distribution Function*). El perfil del *spot* láser se revela así, como una Función de Distribución Lineal Gaussiana (LSF, *Line Spread Function*), la cual se obtiene, finalmente, como la derivada de los datos ESF ajustados, o curva CDF, en la dirección de escaneo.

Con este método se obtuvieron los valores de resolución lateral para dos modos de resolución. El modo de resolución normal, correspondiente a la emisión láser completa desde el núcleo de la fibra, con la que se obtiene un punto focal cuadrado de alrededor de 75 μm de lado. El modo de alta resolución, consiste en la emisión del núcleo de la fibra filtrada por la abertura circular *pinhole* de diámetro 20 μm , para obtener un punto focal de 10 μm . Por último, se realizaron imágenes fotoacústicas de varios elementos de los patrones calibrados USAF, cada uno con un tamaño de barras y un espaciado especificado, para así demostrar la capacidad de imagen en ambos modos de resolución del microscopio ORPAM.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización óptica del haz del PLD

En la Figura 3 se muestran las imágenes ópticas de la sección transversal del haz láser correspondientes al patrón de emisión de la superficie del PLD (a), de un área total de 220x280 μm^2 , donde se comprobó que la altura del apilado vertical de las 3 barras de diodos es un poco mayor que la especificación del fabricante de 220 μm . En la imagen (b) de la figura se observa cómo el área de emisión del PLD se ve reducida a la mitad por la óptica de acoplamiento para poder introducir la mayor potencia óptica posible del PLD en el interior del núcleo de fibra cuadrada de 150 μm . Abajo, en la misma figura, se muestran los puntos focales finales, de sección cuadrada (c) y circular (d), correspondientes a los modos normal y de alta resolución respectivamente. Los tamaños de los *spots* láser, ahora son simétricos en forma y divergencias de haz en ambas direcciones xy del plano transversal a su propagación. Los perfiles de fluencia resultantes se determinaron con el método de la cámara CCD, siendo de 77.2 μm y 12.6 μm respectivamente, midiéndose así valores dentro de los esperados, considerando el error del tamaño de píxel de la cámara de 4.54 μm .

Asimismo, se determinó una distancia de focalización del haz láser, en aire, $WD = 7$ mm, empleando el mismo método de imagen con la cámara CCD. Dicho valor coincide con la longitud focal posterior (BFL, *Back Focal Length*) de la lente del objetivo óptico. Cuando el tubo del objetivo se sumerge en agua durante el funcionamiento del microscopio, la distancia de enfoque de la lente se extiende a $WD = 10$ mm, debido al índice de refracción del agua $n = 1.33$. Gracias a tener una distancia de enfoque de esta longitud se pudo obtener una buena recepción de las ondas ultrasónicas en el transductor lineal, el cual se posicionó a 17.2 mm de distancia del punto focal del láser. También se midieron, con el método del espectrómetro descrito anteriormente, la potencia y la energía del pulso láser entregadas al punto focal láser para ambos modos de resolución, proporcionando 89 W / 8.9 μJ en el *spot* de sección cuadrada, Fig. 3 (c); y, de 1,64 W / 0.16 μJ en el *spot* láser circular, Fig. 3 (d).

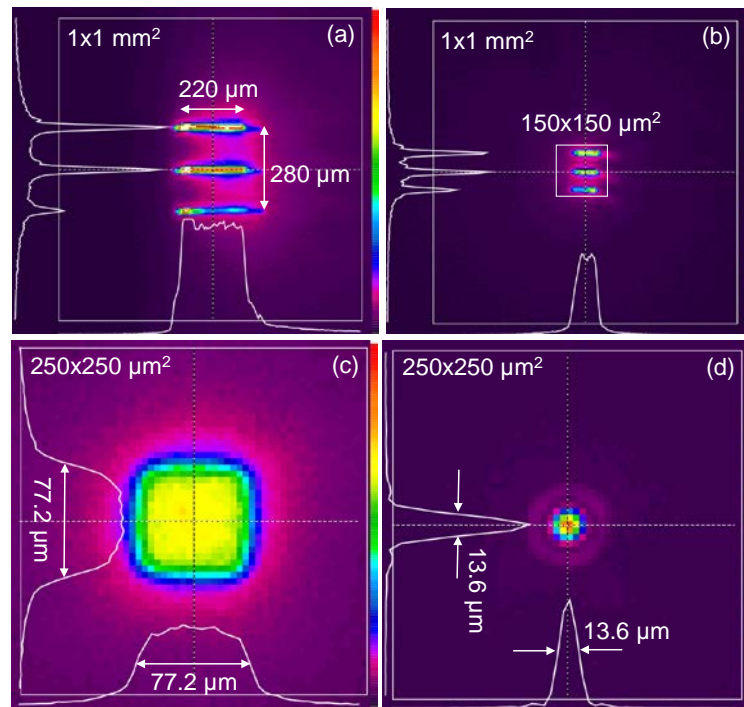


Figura 3 – Perfiles de fluencia de la sección transversal del haz láser en diferentes posiciones de la configuración óptica de transporte de haz. (a) superficie de emisión del PLD (3 barras de 3 diodos cada una); (b) a la entrada de la fibra óptica de núcleo cuadrado; los puntos o *spots* focales cuadrado (c), y circular obtenido mediante filtrado espacial con el *pinole* (d), para la excitación fotoacústica de resolución óptica en los modos normal y de alta resolución, respectivamente.

Además, se midió la pérdida de potencia de 1.7% debido a la transmisión del láser a través del agua.

3.2 Determinación de la resolución lateral del microscopio

En la Figura 4 se muestra la resolución lateral experimental evaluada con el método ESF para ambos modos de resolución. Los puntos experimentales de cada curva ESF corresponden a la media de 5 líneas de escaneo separadas a lo largo del borde de contraste se señal PA, y cada punto se obtuvo promediando la señal PA sobre un número determinado de disparos láser. En el caso de la resolución normal, en la Fig. 4 (a, c), las resoluciones laterales x-y son de $72 \pm 3 \mu\text{m}$ y $75 \pm 2 \mu\text{m}$ (indicándose el intervalo de confianza del ajuste del 95%). Estos valores concuerdan muy bien con las mediciones del perfil óptico del punto focal láser de la Figura 3. Los escaneos de línea de la curva ESF se realizaron en pasos de $10 \mu\text{m}$, con una energía de pulso láser correspondiente a $4.8 \mu\text{J}$ (con el PLD a 35 V, para dar una potencia del 54% de la máxima), y un promediado de señal RF de 1024 para cada punto experimental. Los resultados para el modo de alta resolución se muestran en la Fig. 4 (b, d), con resoluciones laterales medidas de $29 \pm 4 \mu\text{m}$ y $25 \pm 2 \mu\text{m}$, adquiridas para un paso menor de $2 \mu\text{m}$, y también una energía láser mucho menor de 160 nJ (PLD a 65 V, correspondiente a su potencia de emisión máxima), y 1900 de promediado de señales RF. Esta medida está sobredimensionada en comparación con el tamaño óptico del *spot* láser, lo que puede deberse al muy bajo nivel de señal RF recibido por la sonda, cercano a su fondo de ruido electrónico.

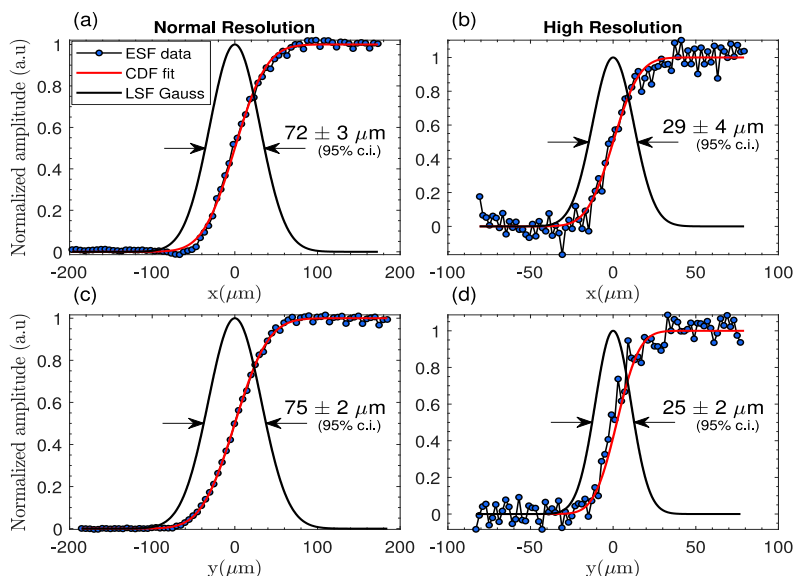


Figura 4 – Curvas de puntos experimentales obtenidas mediante el método ESF, de dispersión de borde del punto focal láser, ajustada mediante la función acumulativa CDF, y su derivada ce perfil Gaussiano, para determinar las resoluciones laterales de los modos normal (a, c) y de alta resolución (b, d).

3.3 Imágenes fotoacústicas de los patrones calibrados USAF-1951

Las imágenes fotoacústicas para el modo de resolución normal se muestran en las Figuras 5 (a, b) correspondientes al grupo 2 - elemento 6 del patrón USAF con 70 μm de ancho de barra, o del espacio; y al grupo 3 - elemento 1 de barras de 62.5 μm de anchura. Estas imágenes PA se adquirieron para 10 μm de tamaño de píxel (o paso de escaneo en x e y). Para ello, se requirió un promediado de señal RF de 128, relativamente bajo debido a la alta energía láser por disparo de 4.8 μJ al 54% de la potencia óptica máxima del PLD, teniendo una SNR superior a 30 dB.

Las imágenes de alta resolución que se muestran en la Figura 5 (c, d) se adquirieron a plena potencia óptica con una energía láser por disparo de 160 nJ, mucho menor debido al filtrado espacial del *pinole*, y por lo que cada píxel se obtuvo después de promediar a 1900 adquisiciones de RF, obteniéndose, finalmente, una SNR superior a 15 dB. La imagen de la Figura 5 (c) es del grupo 4 - elemento 2 del patrón USAF con barras de 28 μm , y escaneadas a un tamaño de píxel de 2 μm . Para comparar directamente las imágenes resultantes entre ambos modos de resolución, se obtuvo la imagen del mismo patrón que en la Figura 5 (b) del modo de resolución normal, empleando un paso de escaneo menor, con un tamaño de píxel de 5 μm .

Comparando los resultados de las imágenes fotoacústicas obtenidas para ambos modos de resolución, se observa claramente la capacidad para resolver los tamaños especificados del patrón USAF, lo que indica, al menos el microscopio posee dicho nivel de resolución. Además, la relación señal a ruido, entre píxeles de señal y píxeles de fondo, en ambos modos supera los 6 dB, generalmente empleados como un criterio mínimo para poder distinguir dos objetos en las imágenes. También se ha comprobado como, efectivamente, la SNR empeora para el modo de alta resolución, ya que el nivel de señal acústica en la sonda para cada píxel de la imagen es aproximadamente 50 veces menor que en el caso de resolución normal. Esto se debe a que la onda acústica y, por tanto, el nivel de señal RF en la sonda es proporcional a energía láser depositada por píxel, que se ve reducida en el modo de alta resolución.

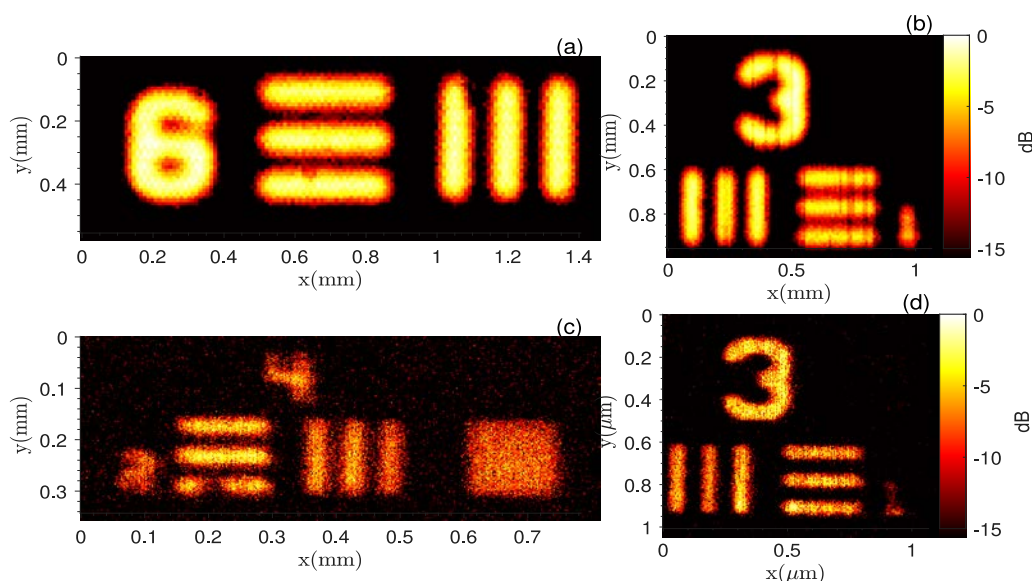


Figura 5 – Imágenes fotoacústicas de los patrones de test de resolución USAF-1951 para los modos de resolución normal (a, b) y alta resolución (c, d). Tipo de patrón, ancho de barra real y tamaño de píxel: (a) G2 – e 6, 70 μm , 10 μm ; (b) G3 – e1, 62.5 μm , 10 μm ; (c) G4 – e2, 28 μm , 2 μm ; (d) G3 – e1, 62.5 μm , 5 μm .

4. CONCLUSIONES

Se ha diseñado y construido un sistema experimental ORPAM basado en un láser PLD de bajo coste acoplado a una fibra óptica multimodo de núcleo cuadrado, que es capaz de alcanzar muy buenas resoluciones laterales, de 75 μm con SNR de 30 dB, y al menos 25 μm con SNR de 15 dB, ambas resoluciones a una distancia de trabajo de 1 cm. Estas cifras son comparables a las de los mejores sistemas ORPAM basados en PLD, indicados en la introducción, y es la primera vez que se obtienen en modo confocal de reflexión, además de emplear para ello un transductor phased-array lineal convencional.

En definitiva, este trabajo ha servido para validar satisfactoriamente el nuevo método óptico propuesto para microscopios fotoacústicos de la clase ORPAM, empleando para ello un transductor lineal convencional, con ancho de banda y sensibilidad limitados para el tipo de ondas acústicas generadas por láseres de baja energía como los PLD. A partir de aquí, se propone mejorar el sistema con el uso de un transductor focalizado de mayor ancho de banda y mayor sensibilidad, por otra parte, de un coste mucho menor que la plataforma de ultrasonidos empleada en este sistema. Adicionalmente, es necesario realizar escaneos de imagen mucho más rápidos, para lo cual se propone sustituir el escaneo mecánico por escaneo de haz láser mediante espejos galvanométricos. Con todo ello, creemos que este sistema puede ser muy buen candidato para alcanzar el objetivo de obtener un microscopio fotoacústico de nivel clínica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el soporte de financiación a través de los programas de convocatorias competitivas: Prometeo CIPROM/2021/003 y Equipamiento e Infraestructuras FEDER 2021-22 IDIFEDER/2021/004; y, también, a la Agència Valenciana de la Innovació (AVI) INNVA2/2022/11, INNVA1/2022/50.

REFERENCIAS

- [1] X. Zhu et al., “Photoacoustic microscopy,” *Laser & Photonics Reviews*, vol. 7, 2013.
- [2] S. Jeon et al., “Review on practical photoacoustic microscopy,” *Photoacoustics*, vol. 15, p. 100141, 2019.
- [3] L. Zeng et al., “Portable optical-resolution photoacoustic microscopy with a pulsed laser diode excitation,” *Applied Physics Letters*, vol. 102, p. 053704, 2013.
- [4] A. Hariri et al., “Development of low-cost photoacoustic imaging systems using very low-energy pulsed laser diodes,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 22, no. 7, p. 075001, 2017.
- [5] M. Erfanzadeh et al., “Laser scanning laser diode photoacoustic microscopy system,” *Photoacoustics*, vol. 9, pp. 1–9, 2018.
- [6] L. Deng et al., “Compact long-working-distance laser-diode-based photoacoustic microscopy with a reflective objective,” *Chin. Opt. Lett.*, vol. 19, no. 7, p. 071701, 2021.