



Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica
Tonantzintla, Puebla, México, agosto de 2008.

Análisis e Implementación de la Video Reflectometría para Aplicaciones Biomédicas.

por

Lic. Margarita Cunill Rodríguez

Tesis que se presenta como requisito
parcial para obtener el grado de Maestra
en Ciencias en la Especialidad de Óptica

Supervisada por:

Dr. Jorge Castro Ramos

Director de Tesis, Coordinación de Óptica, INAOE

Dr. Sergio Vázquez y Montiel

Co-director de Tesis, Coordinación de Óptica, INAOE

©INAOE 2008

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de reproducir y
distribuir copias parciales o totales de esta tesis



Resumen

La determinación de las propiedades ópticas de los tejidos biológicos es de importancia capital para la correcta aplicación y desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas. Por su carácter no invasivo y de no contacto se destaca la técnica de Video Reflectometría la cual actualmente se encuentra en continuo desarrollo y perfeccionamiento. El objetivo general de este proyecto de tesis ha sido implementar y caracterizar una instalación de Video Reflectometría para su desempeño en aplicaciones biomédicas. La formulación de Farrell en el marco de la aproximación de la difusión para un tejido homogéneo y semi-infinito es adoptada tanto para generar datos sintéticos o de prueba como para extraer las propiedades ópticas de las muestras medidas experimentalmente.

El arreglo experimental implementado en este trabajo de tesis en combinación con nuestro código *Videoreflectometria.m* desarrollado en MATLAB®R2006a brinda una herramienta adecuada para el registro de la distribución lateral de la luz difusa en phantoms con propiedades ópticas similares a las de la piel humana, comprobándose que la dependencia experimental de la reflectancia difusa lateral con el coeficiente de esparcimiento reducido está en concordancia con los resultados teóricos esperados.

En el campo teórico se evaluó la precisión para la recuperación de los

parámetros ópticos en curvas de reflectancia de pruebas generadas con datos sintéticos, demostrando que con los errores aleatorios de nuestras mediciones experimentales se pueden extraer las propiedades ópticas de los tejidos sintéticos líquidos preparados para calibrar la instalación experimental.

Finalmente se corroboró que para calibrar el arreglo experimental de Video Reflectometría es imprescindible contar con un estándar o patrón óptico cuyos coeficientes de absorción y de esparcimiento reducido sean conocidos y medidos con precisión.

Dedicatoria

A **mi hija** Yanet

mi máspreciado tesoro... si tu aprobación no hubiera podido nunca culminar este trabajo de tesis, tan lejos de tí, tan lejos de casa.

A **mi esposo** Alberto

por tus consejos oportunos, por tu comprensión e infinito amor durante la estancia en este hermoso país.

A **mi hermana** Susana

por cuidar de mi hija como si fuera yo, por tu apoyo en todas las decisiones importantes en mi vida, por tu cariño de siempre.

A **Anita**

a quien quiero como a una madre, por el apoyo incondicional que siempre he recibido de tí, por estar siempre pendiente de mi hija, tú nieta.

Y a **mis padres**

que gracias a ellos he podido alcanzar mis metas en la vida y que estarán siempre junto a mí, eternamente en mi corazón.

Agradecimientos

*“...Gracias a la vida que me ha dado tanto.
Me ha dado la risa y me ha dado el llanto...”*

Violeta Parra

A mis asesores de tesis: Dr. Jorge Castro Ramos y Dr. Sergio Vázquez y Montiel por las valiosas discusiones de trabajo y enseñanzas recibidas durante el desarrollo de esta tesis. Porque me brindaron mucho más que un apoyo docente: amistad y paciencia para trabajar conmigo. Porque gracias a ellos es que pude llegar a INAOE. Les estaré infinitamente agradecida por todo.

A los sinodales: Dr. Alejandro Cornejo Rodríguez, Dr. Fermín Granados Agustín y Dra. Arllene M. Pérez González por las sugerencias recibidas durante la revisión de la tesis.

Al INAOE por aceptarme como estudiante de maestría en la especialidad de Óptica y recibir además una beca institucional. Al Conacyt por otorgarme una beca como estudiante extranjera durante un año.

Al CEADEN, mi institución en Cuba, por su aprobación para realizar mis estudios de maestría, en especial a mi director Lic. Juan Gualberto Darias.

A mis niños Yanet y Mauricio porque cada día intentan ser mejores personas y buenos estudiantes. Gracias porque mi sacrificio no ha sido en vano.

A mi “pequeña” familia: tías, primos, sobrinos, cuñadas y mi mamá suegra, por el apoyo que recibí de ellos para que realizara este proyecto de tesis.

A mis amigos Arllene Pérez y César Santiago por su ayuda incondicional durante mi estancia en México. Porque nuestra amistad no tiene límites ni fronteras.

A mis amigos Justo y Combarro por la ayuda que siempre he recibido de ellos y porque también contribuyeron a la realización de mis estudios de maestría. A Frías porque odia la burocracia y a Alina por aceptar la dirección del proyecto que iniciamos.

A Edmundo Rodríguez y Helen Zúñiga por su amistad sincera y desinteresada, por los momentos tan alegres compartidos, porque ya son parte de nuestra familia.

A Don Raúl y Doña Serafina por su trato especial.

Al Dr. Javier Báez por su colaboración al facilitar una lente zoom para que se pudieran realizar las mediciones con nuestro arreglo experimental. Al técnico de laboratorio Pedro Tecualt, al ingeniero mecánico Javier Arriaga y a la licenciada Ana María Zárate por suministrar los accesorios y aditamentos para la implementación de la instalación experimental. En este sentido también contribuyó el técnico del taller de pruebas Ópticas Salvador Quechol López.

Al Dr. José Alberto Delgado Atencio por el tiempo dedicado a discernir y discutir algunos temas tratados en esta tesis.

A los compañeros de mi generación por la oportunidad que me dieron de compartir con ellos y por el trato tan respetuoso que recibí de todos. En especial quiero agradecer a Valdivieso, Daniel y Armando por el trabajo en grupo hasta altas horas de la noche y porque hicieron que mi estancia durante los primeros seis meses en el INAOE fuera agradable. También agradezco a mis compañeros del grupo de óptica de los tejidos biológicos: Eber, Carlock y Beatriz por las intervenciones críticas durante mis seminarios de avance de tesis.

A los doctores que conformaron el grupo de profesores de las materias que recibí y de quienes me llevo un grato recuerdo por la calidad de sus clases.

En especial al Dr. Fermín Granados de quien estoy muy agradecida por su paciencia y amabilidad cada vez que lo necesité para que me orientara en las tareas de sus cursos, siempre con su sonrisa que inspira confianza. No puedo pasar por alto a nuestro querido profe Dr. Alejandro Cornejo, a quien admiro profesionalmente y respeto por sus sentimientos humanitarios que contagia a sus estudiantes.

En general agradezco toda la ayuda y orientación recibida del personal de la Biblioteca: Liliana, Gerardo y Jorge; de la Coordinación Docente: Rocío, Martita, Fabiola, Cecy y el Dr. Murphy; de la Coordinación de Óptica Patty, Eicela y Aurora; de la Administración; y de todos los que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este trabajo.

Finalmente doy mil gracias a todos los mexicanos porque no permitieron que me sintiera extranjera en su tierra, porque a donde quiera que fui me sentí segura. Porque Cuba y México siempre serán pueblos hermanos.

Prefacio

El trabajo presentado en esta tesis se llevó a cabo bajo el programa de maestría en Ciencias en la Especialidad de Óptica del Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica (INAOE) de México, con el apoyo recibido de una beca otorgada por esta entidad y posteriormente por una beca otorgada por el Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (Conacyt).

Como parte de las investigaciones desarrolladas en el INAOE en el campo de la óptica médica, esta tesis aborda el tema de la Video Reflectometría, técnica desarrollada desde principios de la década del 90 para la medición de las propiedades ópticas en tejidos biológicos tanto *in-vitro* como *in-vivo*.

El objetivo general de este proyecto de tesis fue implementar y caracterizar una instalación de Video Reflectometría para su desempeño en aplicaciones biomédicas. Los resultados presentados en este trabajo forman parte de las investigaciones básicas de la interacción de la radiación óptica con los tejidos biológicos y que proporcionarán los conocimientos e información necesaria para desarrollar en el futuro equipos más apropiados a las necesidades actuales de la terapia con láser de baja potencia o para el diagnóstico con láser en el campo de la medicina.

En el Capítulo 1 se realiza una introducción a la temática que se plantea como estudio en esta Tesis de Maestría comenzando primeramente por una revisión sobre las técnicas experimentales actuales para la determinación de las propiedades ópticas de los tejidos biológicos, haciendo especial énfasis

en la técnica de medición de la reflectancia difusa resuelta espacialmente. Seguidamente hacemos mención a la teoría del transporte como el fundamento teórico para explicar la interacción de la radiación óptica con los tejidos y finalmente se proporcionan las motivaciones y los objetivos que se abordan en el proyecto de tesis.

En el Capítulo 2 se consideran los fundamentos teóricos de la interacción de la luz con los tejidos biológicos, describiéndose la teoría del transporte para explicar la distribución de la radiación óptica en estos medios. Se analiza la aproximación de la difusión como una de las soluciones de la ecuación de transporte y en las aproximaciones que conducen a la formulación de Farrell para la solución analítica en un medio homogéneo y semi-infinito dado que ésta es la que se empleará durante el desarrollo del proyecto de Tesis.

El Capítulo 3 está dedicado a la temática que se refiere a los modelos de tejidos sintéticos (*phantoms*) como simuladores de las propiedades ópticas de la piel. Se hace énfasis en los modelos de tejidos sintéticos basados en el uso de Intralípidos y en las técnicas experimentales usadas para preparar phantoms con coeficientes de absorción y de esparcimiento controlados. Se describen muy brevemente las características generales de la piel especialmente su estructura, principales elementos de importancia óptica y propiedades ópticas calculadas a la longitud de onda de 633 nm. Finalmente se proponen modelos de tejidos sintéticos que simulan sus propiedades ópticas y el procedimiento o metodología para su diseño.

La implementación del arreglo experimental de Video Reflectometría es presentada en el Capítulo 4, así como también los algoritmos computacionales desarrollados en MATLAB®R2006a para construir la curva de reflectancia y los relacionados con la obtención de los parámetros ópticos a partir de la medición de la reflexión difusa total en las muestras patrones. Se describe el procedimiento del ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales con el modelo analítico, para recuperar las propiedades ópticas en estos modelos de tejidos. Este procedimiento se

evaluó con curvas de reflectancia de pruebas, generadas con algoritmos computacionales también descritos en este capítulo. Finalmente se propuso una instalación experimental para verificar la linealidad de la cámara CCD.

El Capítulo 5 presenta los resultados experimentales obtenidos para la recuperación de los parámetros ópticos en las muestras de tejidos sintéticos líquidos. Se presentaron inicialmente los parámetros ópticos de estos tejidos con sus correspondientes curvas de reflectancia. Se mostraron las curvas de reflectancia obtenidas para un volumen cilíndrico de Teflón y en muestras de leche comercial (Alpura Light 2000), con el objetivo de caracterizar la instalación experimental en cuanto a la repetibilidad de las mediciones realizadas. Se presenta también la recuperación de los parámetros ópticos con curvas de pruebas generadas con datos sintéticos, simulando los errores aleatorios de las mediciones realizadas como a los parámetros ópticos de los modelos de tejidos usados para la calibración de la instrumentación.

Por último, el Capítulo 6 está dedicado a presentar las conclusiones principales de esta tesis de maestría y el trabajo futuro que podrá dar continuidad a la misma.

La Tesis cuenta de cuatro apéndices: A, B, C y D en los que se muestran el código *Videoreflectometria.m*; el código *fzero_f2EXP.m*; el código *Genera_DatosSinteticos.*; y los resultados que corroboran la linealidad de la CCD.

Índice General

Resumen	i
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	v
Prefacio	ix
Capítulo. 1 Introducción	1
1.1 INTRODUCCIÓN	2
1.1.1 Técnicas experimentales para determinar propiedades ópticas	2
1.1.2 Estado actual de la técnica de Video Reflectometría.....	4
1.1.3 Modelos matemáticos.....	9
1.2 MOTIVACIÓN	11
1.3 OBJETIVOS.....	12
1.4 CONCLUSIONES	13
REFERENCIAS	14
Capítulo 2. Fundamentos teóricos	19
2.1 TEORÍA DEL TRANSPORTE RADIATIVO	20
2.2 ECUACIÓN DE TRANSFERENCIA RADIATIVA.....	21
2.3 APROXIMACIÓN DE LA DIFUSIÓN.....	24
2.3.1 Ecuación de la difusión.....	26
2.3.2 Condiciones de frontera.....	28
2.3.3 Ecuación de la difusión para una fuente puntual isotrópica de potencia P_0	30
2.4 FORMULACIÓN DE FARRELL	32
2.5 CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS	38
Capítulo 3. Preparación de Tejidos Sintéticos	39

3.1 INTRODUCCIÓN	40
3.1.1 Modelos de tejidos sintéticos	40
3.1.2 Parámetros ópticos para el intralípido-10%.....	42
3.1.3 La tinta china como absorbente óptico.....	43
3.1.4 Índice de refracción del tejido sintético	44
3.2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA DETERMINAR PROPIEDADES ÓPTICAS.....	45
3.2.1 Método de transmisión colimada.....	45
3.2.2 Método de absorbente añadido.....	47
3.3 CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS GENERALES DE LOS MEDIOS BIOLÓGICOS: LA PIEL.....	48
3.3.1 Estructura de la piel	49
3.3.2 Propiedades ópticas de la piel	50
Coeficiente de absorción en la epidermis y en la dermis.....	51
Coeficiente de esparcimiento en la epidermis y en la dermis	52
3.4 DESCRIPCION DE LOS MODELOS DE TEJIDOS SINTETICOS USADOS	53
3.4.1 Procedimiento usado para el diseño de tejidos sintéticos líquidos..	53
3.4.2 Procedimiento usado para el diseño de tejidos sintéticos sólidos...	54
3.5 CONCLUSIONES.....	55
REFERENCIAS.....	57
Capítulo 4. Instrumentación	59
4.1 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE VIDEO REFLECTOMETRÍA.....	61
4.2 ARREGLO EXPERIMENTAL IMPLEMENTADO.....	61
4.2.1 Programa desarrollado en MATLAB®R2006a para obtener $R_d(r)$.	63
4.2.2 Medición de la reflexión difusa total R_d	65
4.2.3 Programa desarrollado en MATLAB®R2006a para calcular N_p	67
4.3 AJUSTE NO LINEAL DE LOS DATOS EXPERIMENTALES	69
4.3.1 Algoritmos para la recuperación de las propiedades ópticas en tejidos sintéticos con curvas de reflectancia de pruebas	72

4.4	INSTALACIÓN EXPERIMENTAL PROPUESTA PARA VERIFICAR LINEALIDAD DE LA CCD.....	74
4.5	CONCLUSIONES	76
	REFERENCIAS	77
	Capítulo 5. Resultados experimentales	79
5.1	PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS TEJIDOS SINTÉTICOS USADOS.....	80
5.1.2	Curvas de reflectancia de las muestras de tejidos sintéticos líquidos y sólidos a base de agar.....	82
5.2	ESTUDIO DE LA REPETIBILIDAD DE LA CURVA DE REFLECTANCIA	85
5.3	RECUPERACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS CON CURVAS DE REFLECTANCIA DE PRUEBAS.....	88
5.4	RECUPERACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS CON CURVAS DE REFLECTANCIA EXPERIMENTALES	92
5.5	RECUPERACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS CON LA MEDICIÓN DE LA REFLEXIÓN DIFUSA TOTAL.....	96
5.6	CONCLUSIONES	99
	REFERENCIAS	100
	Capítulo 6. Conclusiones	101
6.1	CONCLUSIONES GENERALES	101
6.2	TRABAJO FUTURO	103
	Apéndice	105
A.	Programa <i>Videoreflectometria.m</i>	105
B.	Códigos para calcular el valor de N_p	111
C.	Código <i>Genera_DatosSinteticos.m</i>	113
D.	Verificación de la linealidad de la CCD	115
	Lista de Figuras	117
	Lista de Tablas	121

Capítulo 1

Introducción

En este Capítulo se realiza una introducción a la temática que se plantea como estudio en esta Tesis de Maestría, comenzando primeramente por una revisión sobre las técnicas experimentales actuales para la determinación de las propiedades ópticas de los tejidos biológicos donde se hace especial énfasis en la técnica de medición de la reflectancia difusa resuelta espacialmente. Seguidamente hacemos mención a la teoría del transporte como el fundamento teórico para explicar la interacción de la radiación óptica con los tejidos y finalmente se plantean tanto las motivaciones que originaron la realización de la Tesis como los objetivos trazados para su ejecución y cumplimiento.

1.1 INTRODUCCIÓN

Es fundamental conocer cómo se distribuye la luz en los tejidos biológicos antes de aplicar o desarrollar un método de diagnóstico óptico o de tratamiento con láser.

Como se verá en el Capítulo 2 de la tesis, la distribución de la luz en tales medios puede ser modelada a través de la ecuación de la transferencia radiativa que contiene en sí a los parámetros ópticos del tejido (coeficiente de absorción μ_a y de esparcimiento μ_s), y a la función de fase o esparcimiento. Los tejidos biológicos son considerados en general como medios turbios cuyo coeficiente de absorción brinda información sobre la concentración de determinados cromóforos (sangre, melanina) en tanto el coeficiente de esparcimiento y el factor de anisotropía, g , brindan información sobre la forma, tamaño y concentración de los componentes esparcidores del tejido tales como las fibras de colágeno. Este tipo de información se aplica al campo de la medicina por ejemplo para el diagnóstico del cáncer o en la terapia fotodinámica una vez que puedan ser determinados estos parámetros ópticos, permitiendo una evaluación del estado metabólico de un tejido o la determinación de la dosimetría en aplicaciones terapéuticas del láser, entre otras.

Las razones anteriores motivaron a que grupos de investigación dirigieran sus esfuerzos a implementar técnicas experimentales para medir las propiedades ópticas de los tejidos biológicos.

1.1.1 Técnicas experimentales para determinar propiedades ópticas

Actualmente se han desarrollado un conjunto de técnicas experimentales para determinar las propiedades ópticas de los tejidos biológicos. Entre las diferencias principales están si son aplicables a tejidos *in-vivo* o *in-vitro* y en el tipo de medición óptica que se realiza, por ejemplo: transmisión difusa

total, transmisión colimada, reflexión difusa total, reflexión especular, entre otras.

Entre las técnicas que permiten obtener sólo uno de los parámetros ópticos del tejido *in-vitro* (por ejemplo el coeficiente de atenuación total μ_t) se encuentra el método de la transmisión colimada [1-3] y se realiza sobre muestras muy delgadas de tejidos. Éste se detallará en el Capítulo 3 de la tesis porque conjuntamente con el método del absorbente añadido [1-5] son comúnmente empleados para preparar tejidos sintéticos o phantoms (término que proviene del inglés y al que nos referiremos de manera indistinta a lo largo de este trabajo) con propiedades de absorción y de esparcimiento controladas.

Otra técnica usada para la determinación de los parámetros ópticos es la que se basa en el uso de esferas integradoras para medir los flujos difusos que abandonan la muestra por ambas caras cuando ésta es irradiada con un haz luminoso muy estrecho. El uso combinado de dos esferas integradoras con la muestra colocada en el puerto de salida de la primera y en el de entrada de la segunda permite determinar simultáneamente los tres parámetros ópticos (μ_a , μ_s y g) [6].

También se ha reportado la goniofotometría [7] como una técnica utilizada para estimar la distribución angular de los eventos de esparcimiento simple y la medición que se realiza se puede relacionar con la función de fase o el factor de anisotropía g del medio.

Existe otro grupo numeroso de técnicas que pueden determinar dos parámetros ópticos, por ejemplo al coeficiente de esparcimiento reducido y el de absorción y que en contraste a las descritas anteriormente resultan ser no invasivas, aunque las mediciones en tiempo real se pueden obtener también en muestras *in- vitro*. En general ellas involucran mediciones de la luz reflejada o transmitida difusamente por el tejido, seguidas por técnicas de cómputo o procedimientos apropiados de ajuste para deducir los parámetros ópticos a partir de las magnitudes medidas.

Podemos mencionar algunas de ellas, por ejemplo: la reflectancia difusa resuelta en el tiempo y en el dominio de las frecuencias [8-9]; la coherencia óptica [10]; la radiometría fototérmica pulsada [11]; la reflectancia difusa de la luz linealmente polarizada [12]; la reflectancia difusa resuelta espacialmente [13], entre otras.

De este grupo seleccionamos la técnica de medición de la reflectancia difusa resuelta espacialmente para implementarla a nivel de laboratorio de forma similar a la implementación realizada por Jacques *et al.* [13] a la que denominó como Video Reflectometría, siendo ésta el tema central de esta tesis.

1.1.2 Estado actual de la técnica de Video Reflectometría

La técnica de medición de la reflectancia difusa resuelta espacialmente consiste en registrar la luz reflejada difusamente, $R_d(r)$, en función de la distancia r al punto de incidencia de un haz infinitamente fino que llega normalmente a la superficie del tejido en estudio. El tejido se considera que es un medio homogéneo y semi-infinito y el haz luminoso es continuo en el tiempo. El registro de la luz se puede realizar en general mediante fibras ópticas o con cámaras de video CCD.

Según la literatura revisada, los primeros en proponer esta técnica de medición fueron Groenhuis *et al.* en el año 1983 [14] y que además fundamentaron la teoría para el cálculo de los coeficientes de esparcimiento y de absorción en materiales turbios mediante la obtención de $R_d(r)$ en la aproximación de la difusión [15]. No obstante, en 1976 la teoría de la difusión fue usada por Reynolds *et al.* [16] para determinar la luz esparcida por un medio compuesto únicamente por sangre. En principio, la geometría propuesta por Groenhuis *et al.* para obtener la ecuación que describe a $R_d(r)$ es semejante a la desarrollada en [16] con la diferencia de que ellos modificaron la solución de manera que ésta es función del esparcimiento reducido ($\mu_s' = \mu_s(1-g)$) y la misma es válida además, para la luz esparcida

múltiples veces. También demostraron que la muestra de estudio deberá tener un espesor mayor que el camino libre medio de transporte mfp' (que se discute en detalle en el acápite 2.4 del Capítulo 2). Una de las condiciones de validez de la aproximación de la difusión (Capítulo 2) es precisamente en aquellas regiones alejadas de la frontera y de la fuente. Farrell *et al.* [17] reportaron que en esta aproximación, la luz reflejada difusamente deberá ser registrada a partir de una distancia radial mayor que $1 mfp'$ y que en el caso del trabajo con phantoms la pared del recipiente contenedor deberá encontrarse a una distancia radial de 40 veces el mfp' para que no perturbe las mediciones de $R_d(r)$.

El método experimental propuesto por Groenhuis *et al.*, consistió fundamentalmente en capturar la luz reflejada difusamente con un objetivo de microscopio cuya señal luminosa se envió hacia un fotomultiplicador, el registro de la señal se efectuó en puntos discretos sobre la superficie de la muestra la cual fue movida mediante un sistema de microposicionado x-y. Utilizaron como fuente puntual de luz la de una lámpara de halógeno transmitida a través de una fibra óptica puesta en contacto con la superficie del tejido. En este mismo trabajo, los autores propusieron que para implementar esta técnica en la práctica clínica el objetivo de microscopio debería ser reemplazado por varias fibras ópticas que transmitieran la señal luminosa hacia un detector.

Según refieren y describen Farrell *et al.* [17], entre los primeros trabajos que implementaron el uso de fibras ópticas para la detección de esta señal luminosa, se encuentra el de Wilson *et al.* (1990) cuya sonda de detección contenía 9 fibras ópticas de 400 μm de diámetro más una décima (idénticamente igual) pero actuando como fuente de luz. Esta sonda capturaba la luz reflejada difusamente a una distancia de la fuente desde 1 hasta 10 mm sobre la superficie de un phantom líquido y que a su vez era medida por fotodiodos conectados a un amplificador tipo lock-in.

Posteriormente en 1992, R. Splinter *et al.* [18] propusieron una nueva técnica

para el registro de la luz reflejada difusamente y fue mediante la incorporación de una cámara CCD en interfase con una computadora personal (EDC-1000, Princeton NJ). La cámara utilizada tenía un arreglo bidimensional de 192 x 162 píxeles y resolución de 8 bit, equipada con una lente tipo zoom. Es oportuno destacar que la luz retro esparcida fue caracterizada en primera aproximación mediante la siguiente relación:

$$R_o(\mathbf{r}) = C_1 \exp(-\mu_r r) \quad (1-1)$$

donde C_1 es una constante y μ_r es el coeficiente de regresión exponencial.

Ellos encontraron que la precisión alcanzada al calcular los valores para μ_r en diferentes muestras de tejidos biológicos y en tejidos sintéticos, podía mejorarse aumentando el rango dinámico de la cámara para el registro de la señal.

A tan solo un año de publicado este trabajo, Jacques *et al.* [13], utilizaron también una cámara CCD para el registro de la luz reflejada difusamente, con la diferencia de que extendieron el rango dinámico de la cámara CCD colocando filtros neutros con densidad óptica conocida a la salida de la fuente de luz (láser de Argón, $\lambda=488$ nm). La instalación experimental propuesta, conformada por la fuente de luz dirigida perpendicularmente sobre muestras de tejido *in-vitro* o en phantoms y con la cámara CCD ligeramente fuera de su eje, garantizó esa medición. Simultáneamente colocaron un fotodiodo para medir la reflexión difusa total en toda la muestra. La reflexión difusa fue caracterizada con el modelo del dipolo propuesto por Farrell *et al.* [17] basado en la aproximación de la difusión. Esta instalación será detallada en el Capítulo 4 de la tesis.

En ese mismo año (1993), Bolt *et al.* [19] reportaron el empleo de la Video Reflectometría para estudiar el efecto de la polarización de un haz elíptico enfocado a 100 μm sobre muestras de tejidos sintéticos. La fuente de luz fue un láser de He-Ne sintonizable a las longitudes de onda de 632.8 nm y 543.5 nm, y como detector usaron una cámara CCD de 14 bit, enfriada a -50°C .

Los resultados arrojaron que la luz difusa cambia a circularmente polarizada, y que los coeficientes μ_a y μ_s' pueden ser determinados a través de la curva de reflectancia próximo a la fuente, mediante la aproximación de la difusión propuesta por Groenhuis *et al.*

Desde mediados de la década del 90 aparecieron numerosas publicaciones en donde se plasmaron ideas novedosas en instalaciones de las llamadas técnicas de medición para la reflectancia difusa resuelta espacialmente, entre las que se destacan por ejemplo:

1. La Video Reflectometría de incidencia oblicua por Wang *et al.* en 1995 [20], que mide el desplazamiento lateral de una fuente puntual isotrópica dentro del tejido debido a que el rayo incidente (láser He-Ne, $\lambda=632.8\text{nm}$) no es normal a la superficie del medio sino que entra con un ángulo alfa conocido respecto a la normal de la superficie. Con esta técnica se puede determinar el coeficiente de esparcimiento reducido.
2. La reflectometría de incidencia oblicua con fibras ópticas por Lin *et al.* en 1997 [21] que permitió la obtención del coeficiente de absorción y de esparcimiento reducido. En este trabajo los autores desarrollaron un prototipo a base de fibras ópticas (una fibra fuente con incidencia oblicua y nueve detectoras normales a la superficie del tejido) y propusieron usarlo en mediciones simultáneas de los parámetros ópticos en un intervalo amplio de longitudes de ondas.
3. La Video Reflectometría por Kienle *et al.* [22] en 1996 que mediante una cámara de 14 bit con sistemas de enfriamiento garantizaron la medición de la reflectancia difusa absoluta tanto en muestras *ex-vivo* de tejidos biológicos como en phantoms.
4. La espectroscopía de reflectancia difusa por Nichols *et al.* [23] en 1997, cuyo espectrómetro de reflectancia difusa, compuesto de una lámpara de halógeno con filamento de tungsteno y bulbo de cuarzo de 250 mW, un cabezal circular conformada por 15 fibras ópticas

equidistantes y dos fibras fuentes (una de las cuales se situó en el centro para calibrar la respuesta espectral de la fuente), un espectrógrafo y una CCD de 16 bit con sistema de enfriamiento, garantizaron las mediciones espectroscópicas de los parámetros ópticos μ_s y μ_s' . Los resultados que ellos mostraron fueron alentadores para usarlo en la cuantificación de la absorción *in-vivo* de ciertos cromóforos. Semejantes diseños para instalaciones experimentales de este tipo fueron realizadas por Marquez *et al.* en 1997 [24] y posteriormente el llamado sistema de Rotterdam por Doornbost *et al.* en 1999 [25], quienes la desarrollaron para la determinación de los parámetros ópticos de tejidos humanos *in-vivo*, así como también para la obtención del espectro de absorción del agua y de la hemoglobina.

Trabajos más recientes utilizando la Video Reflectometría han sido reportados por Fabbri *et al.* (2003) [26], por Kim (2004) [27] y por Joshi *et al.* (2006) [28]. Cada uno de estos trabajos presenta contribuciones que no debemos pasar por alto y que describiremos seguidamente.

Los primeros autores mencionados en el párrafo anterior, desarrollaron un método para caracterizar los cambios espaciales o temporales de las propiedades ópticas del tejido mediante la Video Reflectometría, en condiciones de iluminación de haz ancho, para lo cual se empleó un diodo láser divergente emitiendo en 784 nm. Ellos demostraron que la reflectancia difusa relativa, definida como el cociente entre la reflectancia difusa espacial (o temporal) R_2 , por otra R_1 determinada en un punto diferente (o tiempo), es insensible a la geometría de iluminación y detección, lo que hace que las mediciones sean robustas en tejidos *in-vivo*. Además, encontraron que ésta depende de μ_a y μ_s' sólo a través del cociente entre ellas y la dependencia se describe muy bien con una expresión analítica previamente reportada por Jacques [29]. Esa expresión se desvía de los valores experimentales en no más de un 8% para diferentes ángulos de iluminación y de detección dentro de un rango de valores de 0° a 30° , siendo válida aún si la superficie

presenta algunas irregularidades. También demostraron que la reflectancia difusa relativa cambia espacial o temporalmente en una cantidad estimada al cambio correspondiente de $(\mu_a/\mu_s')^{1/2}$.

Por otra parte, Kim realizó un estudio comparativo entre la técnica con esferas integradoras y la de Video Reflectometría para la determinación espectroscópica de los coeficientes de absorción y de esparcimiento reducido en phantoms, encontrando que con esta última se pueden determinar coeficientes de absorción tan bajos como los del agua, mientras que con la esfera integradora se estimó mejor al coeficiente de esparcimiento reducido. Para la detección de la reflexión difusa utilizó una cámara CCD de 16 bit y en principio, empleó el mismo procedimiento que Jacques [13] sólo que expresó a la reflectancia difusa total en función del cociente μ_s'/μ_a .

Por último, Joshi *et al.* [28], contribuyeron con su trabajo a la determinación del factor de anisotropía g del medio, definido como el promedio del coseno del ángulo θ de esparcimiento (ver acápite 2.3.1 Capítulo 2) utilizando la Video Reflectometría de incidencia oblicua. Ellos demostraron el método en muestras de leche desnatada comercialmente disponible y diluida en agua purificada para semejar a las propiedades ópticas de los tejidos biológicos. Utilizaron una fuente de luz blanca con sistemas de lentes de enfoque y posicionando el haz a distintos ángulos de incidencia sobre las muestras líquidas registrando las señales de la luz difusa con una cámara CCD de alto rango dinámico.

1.1.3 Modelos matemáticos

En la introducción mencionamos que los tejidos biológicos son medios generalmente turbios, esto significa que la densidad de partículas esparcadoras es alta con relación a las absorbentes, y por tanto prevalecen los fenómenos de esparcimiento múltiple. Para estos casos los modelos matemáticos que mejor describen la interacción de la radiación óptica con estos medios son la teoría analítica y la teoría del transporte. En esta tesis se

ha adoptado la teoría del transporte como el fundamento teórico para explicar este tipo de interacción, basado en el trabajo desarrollado por Akira Ishimaru [30], y explicado en el Capítulo 2.

La teoría del transporte es nombrada también como la teoría de la transferencia radiativa y la ecuación diferencial básica se le conoce como ecuación de transferencia, la cual tiene un carácter general y mediante su resolución se pueden encontrar magnitudes ópticas que relacionan a la distribución de la luz en el tejido como pueden ser: reflexión especular, reflexión difusa, fracción de la radiación absorbida, fracción de la radiación transmitida, entre otras.

Para obtener una solución analítica de la ecuación de transporte, se realizan aproximaciones al medio de estudio, a la geometría de la radiación incidente y a las condiciones de fronteras, encontrándose diferentes métodos descritos en la literatura como por ejemplo: la teoría de Kubelka-Munk, la aproximación de la difusión y el método de Monte Carlo, entre otros.

Nosotros sólo abordaremos la aproximación de la difusión, haciendo especial énfasis en las aproximaciones que conducen a la formulación de Farrell *et al.* [17] para la solución analítica de la reflexión difusa de la luz en un medio homogéneo, semi-infinito iluminado por una fuente de luz puntual (Capítulo 2).

No obstante, enfatizamos aquí que durante el uso de la teoría de la difusión para resolver problemas concretos de la transferencia radiativa, la mayoría de los autores comparan sus resultados con la solución numérica hallada usando el método de Monte Carlo, convirtiéndose así en el método patrón de las investigaciones en óptica biomédica. Este método permite resolver de forma exacta la ecuación de transferencia radiativa y consiste en esencia en la simulación por métodos computacionales de las trayectorias de los fotones durante su interacción con los centros de absorción y esparcimiento del tejido [31]. Actualmente se ha extendido el uso del código de computadora de dominio público MCML.exe (Monte Carlo Multilayer) para obtener la

distribución estacionaria de la luz en los tejidos estratificados [32].

1.2 MOTIVACIÓN

Está reportado en la literatura que la terapia láser de baja y mediana potencia, principalmente el láser de He-Ne (632,8 nm), puede estimular la producción de colágeno y la microcirculación sanguínea en la zona irradiada, mejorando por tanto la reparación de los tejidos tanto en su regeneración como en la correcta epitelización, de ahí su aplicación en el tratamiento de las heridas. En este sentido, la institución en Cuba de la cual provengo (CEADEN) ha fomentado la colaboración con el Hospital Docente Clínico Quirúrgico “Joaquín Albarrán” a través de un ensayo clínico en humanos para evaluar la eficacia terapéutica del equipo de fabricación nacional, FISSER 25, en la cicatrización de heridas dehiscentes posteriores a la cirugía estética [33].

Aunque se esperan resultados positivos del proyecto anterior, en cuanto a la estimulación de la regeneración de los tejidos y al tiempo de cierre de las heridas con respecto al tratamiento convencional, en muchos de los estudios reportados en la literatura se fundamentan estos resultados sólo desde el punto de vista empírico, siendo notorio que las dosis empleadas para el tratamiento de la cicatrización de las heridas u otras afecciones varían de un autor a otro.

Las razones anteriores nos impulsaron a implementar una técnica no invasiva que nos permitiera monitorear de forma cuantitativa el efecto de la terapia láser sobre el tejido a partir de la suposición de que los cambios producidos en el tejido se manifiestan como un cambio en las propiedades ópticas medidas con una instalación experimental apropiada.

Aprovechando que en el INAOE, en particular en el laboratorio de Óptica, se encontraba en existencia una cámara de video CCD de 8 bit, filtros neutros de diferentes densidades ópticas (0.5, 1, 2, 3 y 4) y de un láser de He-Ne de 35 mW, decidimos implementar una instalación experimental de Video

Reflectometría, con el objetivo de evaluar la factibilidad de su empleo en este laboratorio para las mediciones de los parámetros ópticos μ_a y μ_s' de tejidos simulando las propiedades ópticas de la piel y así crear las bases experimentales y teóricas para atacar en un futuro el problema del monitoreo de la efectividad terapéutica del láser de baja potencia.

Todo el conocimiento relacionado con esta temática permitirá complementar las investigaciones básicas de la interacción de la radiación óptica con los tejidos biológicos que actualmente se realizan por nuestro grupo de trabajo. Además proporcionará en general conocimientos e información necesaria para desarrollar en el futuro equipos más apropiados a las necesidades actuales de la terapia con láser de baja potencia o para el diagnóstico con láser en el campo de la medicina.

1.3 OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto de tesis es implementar y caracterizar una instalación de Video Reflectometría y evaluar su desempeño en aplicaciones biomédicas.

Los objetivos específicos del proyecto son:

1. Preparación de modelos de tejidos sintéticos líquidos descritos en la literatura, con propiedades de esparcimiento que imiten a las de la piel humana mediante el uso del Intralípido-10%, para calibrar nuestra instalación experimental.
2. Implementar la metodología o procedimiento para la preparación de los modelos de tejidos sintéticos sólidos que imitan a la piel, específicamente uno basado en el uso de una matriz de gelatina de agar.
3. Implementación de la técnica de Video Reflectometría para la medición de los parámetros ópticos de estos modelos, previamente calibrados, tales como el coeficiente de esparcimiento y de absorción.

4. Desarrollar algoritmos de extracción de las propiedades ópticas a partir de la medición de la reflectancia difusa resuelta espacialmente obtenida con nuestro arreglo experimental.

1.4 CONCLUSIONES

Se ha presentado el estado actual de la técnica de Video Reflectometría y se ha establecido que será la técnica adoptada en este trabajo de tesis para la medición de la reflectancia difusa resuelta espacialmente y extraer de esta medición las propiedades ópticas de los phantoms usados. El uso de cámaras de video CCD en esta técnica tiene la ventaja de ser no invasiva al proporcionar un método de no contacto con el tejido lo cual la hace atractiva. Además se adopta la aproximación de la difusión como el marco teórico que sirve de base para el desarrollo del modelo matemático (formulación de Farrell) que se empleará para la recuperación de los parámetros ópticos.

REFERENCIAS

- [1] C. J. M. Moes, M. J. C. van Gemert, W. M. Star, J. P. A. Marijnissen, and S. A. Prahl, "Measurements and calculations of the energy fluence rate in a scattering and absorbing phantom at 633 nm," *Appl. Opt.* **28**, 2292- 2296 (1989).
- [2] H. J. van Staveren, C. J. M. Moes, J. van Marle, S. A. Prahl, and M. J. C. van Gemert, "Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm," *Appl. Opt.* **30**, 4507-4514 (1991).
- [3] S. J. Madsen, M. S. Patterson and B. C. Wilson, "The use of India ink as an optical absorber in tissue-simulating phantoms", *Phys. Med. Biol* **37**, 985-993 (1992).
- [4] H. Xu and M. S. Patterson, "Determination of the optical properties of tissue-simulating phantoms from interstitial frequency domain measurements of relative fluence and phase difference," *Opt. Express* **14**, 6485-6501 (2006).
- [5] F. Martelli and G. Zaccanti, "Calibration of scattering and absorption properties of a liquid diffusive medium at NIR wavelengths. CW method," *Opt. Express* **15**, 486-500 (2007).
- [6] J. W. Pickering, S. A. Prahl, N. van Wieringen, J. F. Beek, H. J. C. M. Sterenborg, and M. J. C. van Gemert, "Double-integrating-sphere system for measuring the optical properties of tissue," *Appl. Opt.* **32**, 399-409 (1993).
- [7] B. Grzegorzewski, M. Wietlicka-Piszc and R. Mazur, "Angular dependence of light scattered by bone of the skull," *Proc. SPIE* **1884**, 174-180 (1993).
- [8] M. S. Patterson, B. Chance, and B. C. Wilson, "Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties," *Appl. Opt.* **28**, 2331- (1989).
- [9] M.S. Patterson, J.D. Moulton, B.C. Wilson, K. W. Berndt and J.R. Lakowicz, "Frequency domain reflectance for the determination of the scattering and absorption properties of tissue, *Appl. Opt.* **30**, 4474-4476 (1991).

- [10] G. Yoon, D. N. G. Roy, and R. C. Straight, "Coherent backscattering in biological media: measurement and estimation of optical properties," *Appl. Opt.* **32**, 580-585 (1993).
- [11] S. A. Prahl and I. A. Vitkin, "Determination of optical properties of turbid media using pulsed photothermal radiometry," *Phys. Med. Biol.* **37**, 1203–1217 (1992).
- [12] A. H. Hielscher, J. R. Mourant, and I. J. Bigio, "Influence of particle size and concentration on the diffuse backscattering of polarized light from tissue phantoms and biological cell suspensions," *Appl. Opt.* **36**, 125-135 (1997).
- [13] S. Jacques, A. Gutsche, J. Schwartz, L. Wang, and F. Tittel, "Video reflectometry to specify optical properties of tissue *in vivo*," in *Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring*, edited by G. Mueller, Proceedings of SPIE 1S11, 211-226 (1993).
- [14] R. A. J. Groenhuis, J. J. Ten Bosch, H. A. Ferwerda, "Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 2: Measuring method and calibration", *Appl. Opt.* **22**, 2463-2467 (1983).
- [15] R. A. J. Groenhuis, H. A. Ferwerda, and J. J. Ten Bosch, "Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 1: Theory", *Appl. Opt.* **22**, 2456-2462 (1983).
- [16] L. Reynolds, C. Johnson, and A. Ishimaru, "Diffuse reflectance from a finite blood medium: applications to the modeling of fiber optic catheters," *Appl. Opt.* **15**, 2059- (1976).
- [17] T. J. Farrell, M. S. Patterson and B. Wilson, "A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties *in vivo*," *Med. Phys.* **19**, 879-888 (1992).
- [18] R. Splinter, R. H. Svenson, L. Littmann, J. R. Tuntelder, M. Thompson, G. P. Tatsis, and C. H. Chuang, "Determination of optical properties *in situ* from radial backscattering profile using a CCD camera," *Proc. SPIE* **1646**, 376-382 (1992).

- [19] R. A. Bolt and J. J. Ten Bosch, "Method for measuring position-dependent volume reflection," *Appl. Opt.* **32**, 4641-4645 (1993).
- [20] L. Wang and S. L. Jacques, "Use of a laser beam with an oblique angle of incidence to measure the reduced scattering coefficient of a turbid medium," *Appl. Opt.* **34**, 2362- 2366 (1995).
- [21] S. P. Lin, L. Wang, S. L. Jacques, and F. K. Tittel, "Measurement of tissue optical properties by the use of oblique-incidence optical fiber reflectometry," *Appl. Opt.* **36**, 136-143 (1997).
- [22] A. Kienle, L. Lilge, M. S. Patterson, R. Hibst, R. Steiner, and B. C. Wilson, "Spatially resolved absolute diffuse reflectance measurements for noninvasive determination of the optical scattering and absorption coefficients of biological tissue," *Appl. Opt.* **35**, 2304- (1996).
- [23] M. G. Nichols, E. L. Hull, and T. H. Foster, "Design and testing of a white-light, steady-state diffuse reflectance spectrometer for determination of optical properties of highly scattering systems," *Appl. Opt.* **36**, 93-104 (1997).
- [24] G. Marquez and L. Wang, "White light oblique incidence reflectometer formeasuring absorption and reduced scatteringspectra of tissue-like turbid media," *Opt. Express* **1**, 454-460 (1997).
- [25] R. M. P. Doornbos, R. Lang, M. C. Aalders, F. W. Cross, and H. J. C. M. Sterenborg, "The determination of in vivo human tissue optical properties and absolute chromophore concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy," *Phys. Med. Biol.* **44**, 967-981 (1999).
- [26] F. Fabbri, M. A. Franceschini, and S. Fantini, "Characterization of Spatial and Temporal Variations in the Optical Properties of Tissuelike Media with Diffuse Reflectance Imaging," *Appl. Opt.* **42**, 3063-3072 (2003).
- [27] Beop-Min Kim, "Optical Property Measurements of Turbid Media Using Continuous-Wave Light Sources," *Journal of the Korean Physical Society* **44**, 427-434 (2004).
- [28] N. Joshi, C. Donner, and H. W. Jensen, "Noninvasive measurement of scattering anisotropy in turbid materials by nonnormal incident illumination,"

Opt. Lett. **31**, 936-938 (2006).

[29] S. L. Jacques, "Diffuse reflectance from a semiinfinite medium," (1999), <http://omlc.ogi.edu/news/may99/rd/index.html>

[30] A. Ishimaru, *Wave propagation and Scattering in Random Media* (Academic Press, 1978).

[31] S. A. Prahl, "Light Transport in Tissue," PhD thesis, University of Texas at Austin, (1988), <http://omlc.ogi.edu/pubs/prahl-pubs/index.html>

[32] L. Wang, S.L. Jacques and L. Zheng, "MCML-Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues," *Computers Methods and Programs in Biomedicine* **47**, 131-146 (1995).

[33] Margarita Cunill, Humberto Álvarez, Andrés Combarro, Ricardo G. Limonta, Nancy Cabrera, Alina Orellana y Elva Álvarez, "Empleo del equipo laserterapéutico FISSER 25 en dehiscencias de heridas de cirugía estética. Resultados preliminares". *Memorias del evento Tecnoláser*, CD: ISSN- 1607-6281, (2003).

Capítulo 2

Fundamentos teóricos

En este capítulo se describe la teoría del transporte como el fundamento teórico para explicar la distribución de la luz en los tejidos biológicos basado principalmente en el trabajo realizado por Akira Ishimaru [1]. Se analiza la aproximación de la difusión como una de las soluciones de la ecuación de transporte. Se hace especial énfasis en las aproximaciones que conducen a la formulación de Farrell para la solución analítica de un medio homogéneo y semi-infinito dado que ésta es la que se empleará durante el desarrollo de este proyecto de Tesis como modelo óptico que explica la distribución espacial de la luz en los phantoms estudiados, además de constituir el modelo matemático adoptado para realizar el ajuste de los datos experimentales.

2.1 TEORÍA DEL TRANSPORTE RADIATIVO

Describir la interacción de la luz con los tejidos biológicos es realmente muy complejo porque éstos son medios altamente esparcidos y las conocidas leyes de la óptica geométrica para el trazo de rayos se hacen difíciles de aplicar. En el campo de la óptica biomédica la distribución de la luz puede ser modelada a través de la Teoría Analítica o por medio de la Teoría del Transporte.

La Teoría Analítica se refiere al uso de las ecuaciones de Maxwell para describir la propagación del campo electromagnético interactuando con las propiedades dieléctricas del medio, siendo las magnitudes estadísticas como la varianza y funciones de correlación, las incógnitas; esta teoría puede incluir en principio el esparcimiento múltiple, la difracción e interferencia. Son pocas las soluciones aproximadas útiles que ella brinda tales como la teoría de Mie que describe el esparcimiento de una onda plana infinita por una esfera homogénea y dieléctrica, o para el caso de geometrías más complejas el método de las diferencias finitas en el dominio del tiempo.

La teoría del transporte se refiere al transporte de la energía a través de un medio que contiene partículas, es una teoría heurística que no incluye efectos de difracción ni de interferencia, asumiéndose que no hay correlación entre los campos. Nosotros nos referiremos a la obtención clásica por Ishimaru [2] donde tampoco se incluye el efecto de la polarización por conveniencia matemática.

La teoría del transporte, nombrada también como teoría de la transferencia radiativa, fue iniciada por Schuster en el año 1903, y a la ecuación diferencial básica de esta teoría se le conoce como ecuación de transferencia o ecuación de transferencia radiativa y es equivalente a la ecuación de Boltzmann usada en la teoría cinética de los gases y en la de transporte de neutrones. Esta teoría resuelve diversos fenómenos físicos citando por ejemplo la propagación de la energía radiante en la atmósfera de los

planetas, las estrellas y galaxias; problemas atmosféricos y de visibilidad bajo el mar; biología marina; entre otros.

2.2 ECUACIÓN DE TRANSFERENCIA RADIATIVA

Se puede obtener la ecuación de transferencia radiativa a partir del principio de conservación de la energía y definiendo algunas magnitudes.

Definamos la Intensidad específica $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ [2] como el promedio de la densidad del flujo de potencia en la dirección \mathbf{s} en una banda de frecuencia unitaria centrada en la frecuencia ν dentro de un ángulo sólido unitario, y analizada en un punto \mathbf{r} de un medio aleatorio de partículas (figura 2.1). Esta magnitud se mide en $[\text{W m}^{-2} \text{sr}^{-1} \text{Hz}^{-1}]$.

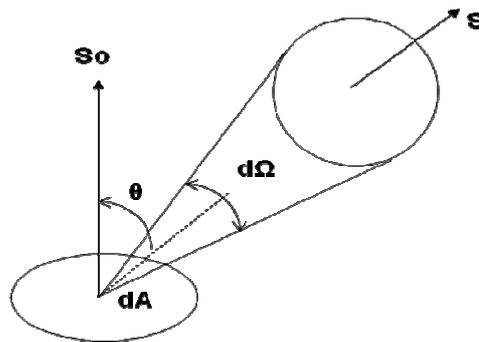


Figura 2.1 Representación esquemática del flujo de energía, a través de un diferencial de área dA dentro de un diferencial de ángulo sólido unitario $d\Omega$.

Consideremos que el medio contiene partículas aleatorias que esparcen y absorben la energía luminosa. Sea la intensidad específica $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ incidiendo sobre un diferencial de volumen cilíndrico con sección transversal unitaria dA y longitud ds , como se muestra en la figura 2.2. El volumen $dv = dsdA$, contiene ρds partículas, donde ρ es el número de partículas por unidad de volumen y se conoce como densidad numérica.

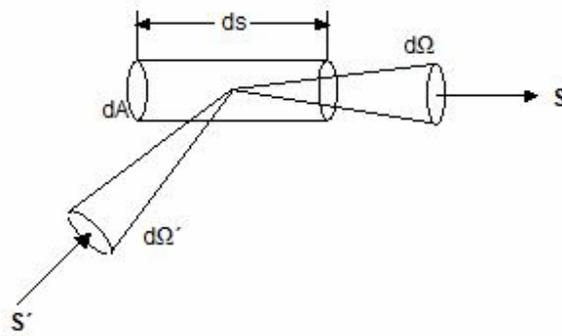


Figura 2.2 Elemento de volumen cilíndrico estacionario usado para deducir heurísticamente la ecuación de transporte.

Cada partícula absorbe la potencia $\sigma_a I$ y esparce la potencia $\sigma_s I$, donde: σ_a y σ_s son la sección transversal de absorción y de esparcimiento respectivamente, por tal motivo disminuye la intensidad específica $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ por el diferencial de volumen ds y queda expresado como:

$$dI(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = -ds(\sigma_a + \sigma_s)I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = -\rho ds \sigma_t I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (2-1)$$

A la magnitud $\sigma_t = (\sigma_a + \sigma_s)$ se le conoce como sección transversal total o de extinción.

Al mismo tiempo la intensidad específica $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ aumenta debido a que sobre este diferencial de volumen incide una parte de la intensidad específica proveniente de otras direcciones como \mathbf{s}' y que se esparce en la dirección \mathbf{s} y por lo tanto se le suma a la intensidad específica $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$.

Para determinar esta contribución, se considera una onda incidente sobre una partícula en la dirección \mathbf{s}' . La densidad del flujo de potencia incidente, S_i , a través de un pequeño ángulo sólido $d\Omega'$, se expresará entonces como:

$$S_i = I(\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\Omega' \quad (2-2)$$

y la densidad del flujo de potencia esparcida S_r , por una sola partícula en la dirección \mathbf{s} , a una distancia R de la partícula se expresará como:

$$S_r = \left[\frac{|f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')|^2}{R^2} \right] S_i \quad (2-3)$$

donde $f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ se define como la amplitud de esparcimiento, y representa la

amplitud, fase y polarización de la onda esparcida en el campo lejano en la dirección \mathbf{s} , cuando la partícula es iluminada por una onda plana que se propaga en la dirección \mathbf{s}' .

La expresión (2-3) se obtiene de la siguiente definición de la sección transversal diferencial de esparcimiento de una partícula que, para campos lejanos, se define como [3] :

$$\sigma_d(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = \left[\frac{R^2 Sr}{Si} \right] = |f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')|^2 = \left(\frac{\sigma_t}{4\pi} \right) p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \quad (2-4)$$

donde: $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ es una magnitud adimensional conocida como función de fase y se relaciona con la cantidad de potencia esparcida.

La sección trasversal de esparcimiento de una partícula se expresará por lo tanto como:

$$\sigma_s = \int_{4\pi} \sigma_d d\Omega = \int_{4\pi} |f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')|^2 d\Omega = \frac{\sigma_t}{4\pi} \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega \quad (2-5)$$

De esta expresión se define entonces el albedo para una partícula:

$$w_0 = \frac{\sigma_s}{\sigma_t} = \frac{1}{\sigma_t} \int_{4\pi} |f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')|^2 d\Omega = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega \quad (2-6)$$

Volviendo a la expresión 2-3, la intensidad específica esparcida en la dirección \mathbf{s} debido a Si (2-2) es por lo tanto [2]:

$$SrR^2 = |f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')|^2 Si = |f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')|^2 I(\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\Omega' \quad (2-7)$$

Sumando el flujo incidente proveniente de todas las direcciones \mathbf{s}' , la intensidad específica esparcida hacia la dirección \mathbf{s} por ρds partículas en el volumen ds , queda expresado como:

$$\int_{4\pi} \rho ds |f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')|^2 I(\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\Omega' \quad (2-8)$$

Mediante la expresión 2.4, podemos escribir la función de fase como:

$$p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = \left(\frac{4\pi}{\sigma_t} \right) |f(\mathbf{s}, \mathbf{s}')|^2 \quad (2-9)$$

y con ella expresar la integral 2.8 de la siguiente forma:

$$\frac{\sigma_t}{4\pi} \int_{4\pi} \rho ds p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') / (\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\Omega' \quad (2-10)$$

Por otra parte, la intensidad específica también puede incrementarse en la dirección \mathbf{s} debido a una fuente de emisión dentro del diferencial de volumen ds . Denotando a $\varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ como la radiación de potencia emitida por unidad de volumen, por unidad de ángulo sólido y por unidad de frecuencia en la dirección \mathbf{s} , la intensidad específica adicionada en esta dirección será:

$$ds\varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (2-11)$$

Finalmente podemos obtener la ecuación de transferencia sumando las contribuciones dadas por las expresiones (2-1), (2-10) y (2-11), esto es:

$$\frac{dI(\mathbf{r}, \mathbf{s})}{ds} = -\rho\sigma_t I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \frac{\rho\sigma_t}{4\pi} \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') / (\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\Omega' + \varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (2-12)$$

Esta es una ecuación íntegro-diferencial para la intensidad específica que describe la propagación de la intensidad de la luz en el tejido y contiene además los parámetros ópticos del medio. Derivar una solución analítica no es difícil si se realizan aproximaciones por ejemplo al medio de estudio, a la radiación incidente y a las condiciones de frontera [2].

Existen varios métodos descritos en la literatura para hallar la solución de la ecuación de transporte tales como la aproximación de la difusión [4], la teoría de Kubelka-Munk [5], y el método de Monte Carlo [6].

Nosotros sólo abordaremos la aproximación de la difusión, continuando con la notación seguida fundamentalmente por Ishimaru [4].

2.3 APROXIMACIÓN DE LA DIFUSIÓN

Para obtener la ecuación de la difusión y con ella una solución analítica de la ecuación de transporte, se realizan un conjunto de aproximaciones que se irán enumerando por orden de aparición.

1. El cociente del volumen ocupado por las partículas esparcidas y el volumen total del medio (densidad de volumen) es $\gg 1\%$.
2. La intensidad específica total se divide en dos partes: la intensidad

incidente reducida (I_{ri}), la cual representa la intensidad que disminuye debido al esparcimiento y a la absorción, y la *intensidad difusa* (I_d) que representa la intensidad que se origina dentro del medio debido al esparcimiento [4]:

$$I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = I_{ri}(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (2-13)$$

La intensidad difusa satisface la ecuación:

$$\frac{dI_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})}{ds} = -\rho\sigma_t I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \frac{\rho\sigma_t}{4\pi} \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\Omega' + \varepsilon_{ri}(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (2-14)$$

donde ε_{ri} es la función de fuente equivalente generada por la intensidad incidente reducida, y se expresa como sigue:

$$\varepsilon_{ri}(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = \frac{\rho\sigma_t}{4\pi} \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') I_{ri}(\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\Omega' \quad (2-16)$$

3. La intensidad difusa encuentra muchas partículas y es esparcida “casi uniformemente” en todas las direcciones, pero con una magnitud ligeramente mayor en la dirección de propagación del flujo neto de corriente. Matemáticamente esta situación se describe como sigue:

$$I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \approx U_d(\mathbf{r}) + c F_d(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{s} \quad (2-17)$$

donde c es una constante igual a $\frac{3}{4\pi}$; $F_d(\mathbf{r})$ es el vector de flujo difuso

definido, según la dirección del vector unitario \mathbf{s}_f , como:

$$F_d(\mathbf{r}) = \int_{4\pi} I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \mathbf{s} d\Omega = F_d(\mathbf{r}) \mathbf{s}_f \text{ y se mide en } [W \text{ m}^{-2} \text{ Hz}^{-1}] \quad (2-18)$$

y por último, $U_d(\mathbf{r})$ es la intensidad difusa promedio definida como:

$$U_d(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) d\Omega, \text{ medida también en } [W \text{ m}^{-2} \text{ Hz}^{-1}] \quad (2-19)$$

Una representación esquemática de $I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ se muestra en la figura 2.3, siendo la ecuación (2-17) la aproximación de la difusión para la intensidad difusa.

Por lo tanto se procede en el próximo acápite a obtener la ecuación de la difusión basada en esta aproximación.

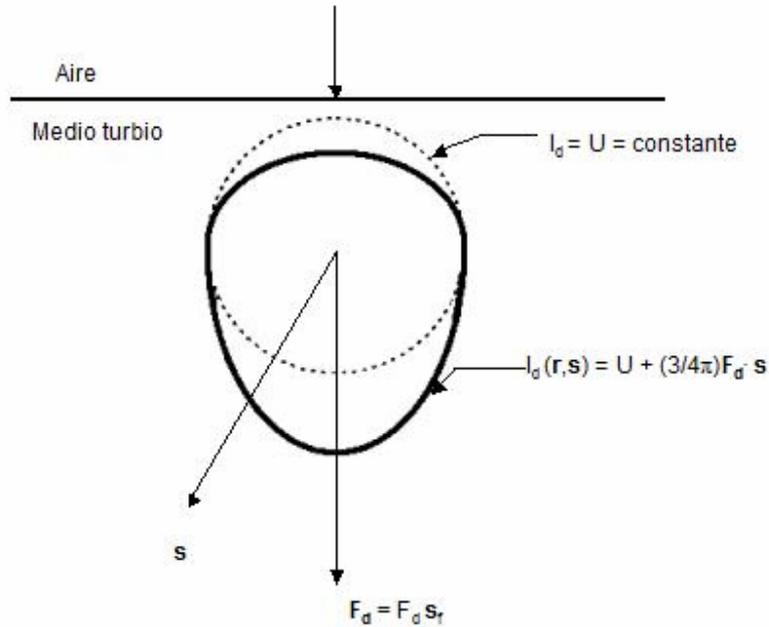


Figura 2.3 Intensidad difusa $I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ en la aproximación de la difusión. La línea gruesa horizontal es la interfase aire-medio turbio.

2.3.1 Ecuación de la difusión

Primero que todo se comienza a escribir el lado izquierdo de la ecuación de transporte para la intensidad difusa (2-14) mediante el siguiente operador de gradiente o divergencia:

$$\frac{dI_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})}{ds} = \mathbf{s} \cdot \text{grad} I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = \text{div} [I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \mathbf{s}], \text{ y } \text{div } \mathbf{s} = 0 \quad (2-20)$$

luego, ésta se integra por todo el espacio del ángulo sólido 4π y se obtiene la siguiente relación general de potencia:

$$\text{div} F_d(\mathbf{r}) = -4\pi\rho\sigma_a U_d(\mathbf{r}) + 4\pi\rho\sigma_s U_{ni}(\mathbf{r}) + E(\mathbf{r}) \quad (2-21)$$

donde:

$$U_{ni}(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} I_{ni}(\mathbf{r}, \mathbf{s}) d\Omega \text{ y } E(\mathbf{r}) = \int_{4\pi} \varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s}) d\Omega \quad (2-22)$$

Si se sustituye ahora la ecuación (2-17) en (2-14), y se asume que la función de fase $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ es una función del ángulo entre la dirección de incidencia \mathbf{s} y

de esparcimiento \mathbf{s}' , se obtiene la expresión siguiente:

$$\mathbf{s} \cdot \text{grad}U_d + \frac{3}{4\pi} \mathbf{s} \cdot \text{grad}(F_d \cdot \mathbf{s}) = -\rho\sigma_t U_d - \frac{3}{4\pi} \rho\sigma_t F_d \cdot \mathbf{s} + \rho\sigma_s U_d + \frac{3}{4\pi} \rho\sigma_t F_d \cdot \mathbf{s} p_1 + \varepsilon_{\tilde{n}} + \varepsilon \quad (2-23)$$

siendo p_1 expresado por:

$$p_1 = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \mathbf{s} \cdot \mathbf{s}' d\Omega' \quad (2-24)$$

Si se define a g como el promedio del coseno del ángulo de esparcimiento θ , conocido como factor de anisotropía del medio, expresado por (2-25), y aproximando la función de fase a la fórmula conocida por Henyey-Greenstein [7] propuesta en el año 1941 para explicar el esparcimiento de la luz de las estrellas por la materia interestelar, la función de fase quedará expresada por la ecuación (2-26). Como se observa, ésta queda en función del albedo W_0 de una partícula y de g ,

$$g = \langle \cos \theta \rangle = \frac{\int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \cos \theta d\Omega'}{\int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega'} \quad (2-25)$$

donde $\cos \theta = \mathbf{s} \cdot \mathbf{s}'$

$$p(\cos \theta) = w_0 (1 - g^2) [1 + g^2 - 2g \cos \theta]^{-\frac{3}{2}} \quad (2-26)$$

Multiplicando la ecuación (2-23) por \mathbf{s} e integrando por 4π , se obtiene la siguiente expresión para el gradiente de la intensidad difusa promedio:

$$\text{grad}U_d = -\frac{3}{4\pi} \rho\sigma_t (1 - p_1) F_d + \frac{3}{4\pi} \int_{4\pi} \varepsilon_{\tilde{n}}(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \mathbf{s} d\Omega + \frac{3}{4\pi} \int_{4\pi} \varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \mathbf{s} d\Omega \quad (2-27)$$

La magnitud $\sigma_t(1 - p_1)$ se conoce como sección transversal de transporte e indica que si el esparcimiento es anisotrópico, la sección transversal total equivalente es reducida por el factor $1 - p_1$ del caso isotrópico. La sección transversal de transporte (teniendo en cuenta que $p_1 = W_0 g$) se puede escribir también como:

$$\sigma_{tr} = \sigma_t(1 - p_1) = \sigma_s(1 - g) + \sigma_a \quad (2-28)$$

Si la densidad de partículas aumenta la sección transversal de esparcimiento

equivalente disminuye por el factor $1-H$, donde H es el cociente del volumen ocupado por los esparcidosores al volumen total. En términos de ρ y del volumen V_e de un simple esparcidor, H es igual a ρV_e :

$$\sigma_s \rightarrow \sigma_s(1-H) \quad (2-29)$$

y por tanto la sección transversal de transporte σ_{tr} para un medio de alta densidad será entonces:

$$\sigma_{tr} \rightarrow \sigma_s(1-H)(1-g) + \sigma_a \quad (2-30)$$

Despejando F_d de la expresión 2.27 y sustituyéndola en la (2-21), se obtiene la ecuación diferencial para la intensidad difusa promedio, $U_d(\mathbf{r})$:

$$\begin{aligned} \nabla^2 U_d(\mathbf{r}) - k_d^2 U_d(\mathbf{r}) = & -3\rho\sigma_s\rho\sigma_{tr}U_{ii}(\mathbf{r}) - \frac{3}{4\pi}\rho\sigma_{tr}E(\mathbf{r}) \\ & + \frac{3}{4\pi}\nabla \cdot \int_{4\pi} \varepsilon_{ii}(\mathbf{r}, \mathbf{s})\mathbf{s}d\Omega + \frac{3}{4\pi}\nabla \cdot \int_{4\pi} \varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s})\mathbf{s}d\Omega \end{aligned} \quad (2-31)$$

$$\text{donde } k_d^2 = 3\rho\sigma_a\rho\sigma_{tr} \quad (2-32)$$

Esta es la ecuación fundamental de la difusión en estado estacionario para la intensidad difusa promedio $U_d(\mathbf{r})$, que junto con determinadas condiciones de fronteras, conforman la descripción matemática completa de la aproximación de la difusión. Una vez que la intensidad difusa sea encontrada, el flujo F_d se puede calcular por medio de la expresión (2-27).

Esta aproximación de la difusión es válida en aquellas regiones alejadas de la frontera y de la fuente.

2.3.2 Condiciones de frontera

La condición de frontera exacta para la intensidad difusa I_d es que sobre la superficie del medio no existe radiación difusa entrando al mismo y por tanto la intensidad difusa deberá apuntar siempre hacia fuera, matemáticamente esto se expresa como [4]:

$$I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})=0 \text{ cuando } \mathbf{s} \text{ está apuntando hacia adentro.}$$

Sin embargo, como se observa de la ecuación (2-17), $I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ tiene una simple

distribución angular, lo que conduce a que la ecuación de la difusión quede en términos de $U_d(\mathbf{r})$, por tal motivo la condición de frontera anterior no se satisface exactamente siendo necesario recurrir a una condición de frontera aproximada en la superficie y es que el flujo difuso total dirigido hacia adentro sea cero, matemáticamente esto se expresa como sigue:

$$\int_{2\pi} I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})(\mathbf{s} \cdot \mathbf{n}) d\Omega = 0 \quad (2-33)$$

donde \mathbf{n} es un vector unitario apuntando normalmente hacia adentro, y la integración es por 2π en el hemisferio $\mathbf{s} \cdot \mathbf{n} > 0$, como se muestra en la figura 2.4.

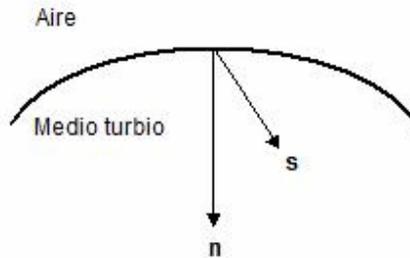


Figura 2.4 Diagrama que ilustra la aplicación de la condición de frontera aproximada usada en la aproximación de la difusión. La condición de frontera exacta es inaplicable en esta aproximación.

Esta condición de frontera puede ser expresada sólo en términos de la intensidad promedio U_d :

$$U_d(\mathbf{r}_s) - \frac{2}{3\rho\sigma_{tr}} \frac{\partial}{\partial n} U_d(\mathbf{r}_s) + 2n \cdot \frac{Q_1(\mathbf{r}_s)}{4\pi} = 0, \quad (\mathbf{r}=\mathbf{r}_s) \quad (2-34)$$

donde:

$$Q_1 = \frac{1}{\rho\sigma_{tr}} \int_{4\pi} [\varepsilon_{ri}(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s})] \mathbf{s} d\Omega \quad (2-35)$$

En ausencia de fuentes $\varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s})=0$ y por tanto Q_1 puede describirse usando la relación (2-16), como:

$$Q_1 = \frac{\sigma_t}{\sigma_{tr}} \int_{4\pi} d\Omega' \left[\frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \mathbf{s} d\Omega \right] I_{ri}(\mathbf{r}, \mathbf{s}') \quad (2-36)$$

Si los esparcidosores son isotrópicos, $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')=constante$ y por ende $Q_1=0$, por lo

que la condición de frontera para este caso particular quedará expresada como:

$$U_d(\mathbf{r}_s) - \frac{2}{3\rho\sigma_{tr}} \frac{\partial}{\partial n} U_d(\mathbf{r}_s) = 0 \quad (2-37)$$

2.3.3 Ecuación de la difusión para una fuente puntual isotrópica de potencia P_0

Para el caso particular de una fuente puntual isotrópica localizada en un medio infinito, el término de la fuente se expresa como [4]:

$$\varepsilon(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = \left(\frac{P_0}{4\pi}\right)\delta(\mathbf{r}) \quad (2-38)$$

y por tanto la ecuación de la difusión quedará expresada como sigue:

$$\nabla^2 U_d(r) - k_d^2 U_d(r) = -\frac{3}{4\pi} \rho\sigma_{tr} P_0 \delta(\mathbf{r}) \quad (2-39)$$

cuyas soluciones para $U_d(\mathbf{r})$ y $F_d(\mathbf{r})$ son:

$$U_d(\mathbf{r}) = \frac{\exp(-k_d r)}{4\pi r} \left[\frac{3}{4\pi} \rho\sigma_{tr} P_0 \right] \quad (2-40)$$

$$F_d(\mathbf{r}) = -\frac{\partial}{\partial r} \left[\frac{\exp(-k_d r)}{4\pi r} \right] P_0 \mathbf{r} = \left[\frac{k_d}{4\pi r} + \frac{1}{4\pi r^2} \right] \exp(-k_d r) P_0 \mathbf{r} \quad (2-41)$$

Sólo analizaremos este caso particular dada la importancia que tiene en posteriores análisis teóricos y cuya solución anterior se retomará para recrear la conocida formulación de Farrell.

Antes de proceder a desarrollar el próximo acápite de la formulación de Farrell, transformaremos primero esta ecuación de la difusión y la solución para $U_d(\mathbf{r})$ en términos de los coeficientes de absorción, de esparcimiento y del factor de anisotropía del medio de estudio.

Los coeficientes de absorción, de esparcimiento y de transporte del medio se definen como μ_a , μ_s y μ_{tr} respectivamente:

$$\mu_a = \rho\sigma_a; \mu_s = \rho\sigma_s \text{ y } \mu_{tr} = \rho\sigma_{tr} \quad (2-42)$$

Para un medio altamente esparcidor las expresiones (2-29) y (2-30) son

aplicables, luego el coeficiente de transporte puede ser expresado como:

$$\mu_{tr} = \rho\sigma_{tr} = \rho\sigma_s(1-g) + \rho\sigma_a = \mu_s(1-g) + \mu_a \quad (2-43)$$

Definiendo además al coeficiente de esparcimiento reducido μ_s' , como:

$$\mu_s' = \mu_s(1-g) \quad (2-44)$$

el coeficiente de transporte podrá expresarse por lo tanto como:

$$\mu_{tr} = \mu_s' + \mu_a \quad (2-45)$$

conocido también en la literatura bajo el nombre de coeficiente de interacción total μ_t' , terminología que también emplearemos durante el desarrollo de este trabajo.

Teniendo en cuenta las definiciones anteriores el término k_d^2 puede describirse como:

$$k_d^2 = 3\mu_a[\mu_a + \mu_s(1-g)] = 3\mu_a[\mu_a + \mu_s'] \quad (2-46)$$

Si se define el coeficiente de atenuación efectivo μ_{eff} y el coeficiente de difusión D del medio según las siguientes relaciones:

$$\mu_{eff} = (3\mu_a[\mu_a + \mu_s'])^{\frac{1}{2}} \quad (2-47)$$

$$D = \frac{1}{3[\mu_a + \mu_s(1-g)]} \quad (2-48)$$

entonces k_d^2 puede quedar expresado tanto por μ_{eff}^2 como por D y μ_a según la siguiente ecuación:

$$k_d^2 = \mu_{eff}^2 = \frac{\mu_a}{D} \quad (2-49)$$

Por consiguiente se puede describir la ecuación de la difusión (2-39) y la solución para $U_d(\mathbf{r})$ (2-40), a través de las expresiones (2-50) y (2-51), encontradas con esta terminología en la mayoría de los artículos científicos relacionados con esta temática.

$$\nabla^2 U_d(\mathbf{r}) - \frac{\mu_a}{D} U_d(\mathbf{r}) = -\frac{P_0}{4\pi D} \delta(\mathbf{r}) = -\frac{P_0}{4\pi} \frac{\mu_{eff}^2}{\mu_a} \delta(\mathbf{r}) \quad (2-50)$$

$$U_d(\mathbf{r}) = \frac{P_0}{4\pi} \frac{\exp(-\mu_{\text{eff}} r)}{4\pi D r} \quad (2-51)$$

Definiendo $4\pi U_d(\mathbf{r}) = \phi(\mathbf{r})$, entonces la ecuación anterior se puede expresar equivalentemente como:

$$\phi(\mathbf{r}) = \frac{P_0}{4\pi D} \frac{\exp(-\mu_{\text{eff}} r)}{r} \quad (2-52)$$

siendo ésta la notación actual referida en los artículos que hacen alusión al ritmo de fluencia (de la traducción del inglés *fluence rate*).

2.4 FORMULACIÓN DE FARRELL

Farrell *et al.* [8] propusieron un modelo, basado en la teoría de la difusión de estado estacionario, que describe la dependencia radial de la luz reflejada difusamente $R_d(r)$ por un tejido con geometría semi-infinita y homogéneo, irradiado con un haz de luz muy estrecho con incidencia normal a la superficie, como por ejemplo un haz colimado. Utilizando el modelo de una fuente dipolar aplicaron las condiciones de fronteras adecuadas para interfases acopladas y desacopladas en cuanto al índice de refracción.

A continuación desarrollaremos el procedimiento descrito por estos autores con el objetivo de obtener la expresión analítica para $R_d(r)$ a una distancia r de la fuente de luz, pero solamente para interfases desacopladas en cuanto al índice de refracción como por ejemplo aire-tejido.

Tal situación es precisamente la que se presenta al aplicar la técnica de Video Reflectometría, cuya instalación experimental se detalla en el Capítulo 4 y mediante la cual se pueden determinar las propiedades ópticas del tejido de estudio.

La geometría del modelo propuesto se ilustra en la figura 2.5 (superior e inferior). En la parte superior de esta figura se observa que del haz estrecho de luz con incidencia normal a la interfase entre el tejido y el medio no

esparcidor (medio externo) con índices de refracción n_t y n respectivamente, emerge luz reflejada difusamente a una distancia r de la fuente; se muestra también una distribución de fuentes puntuales de esparcimiento isotrópico a lo largo del eje z .

El ritmo de fluencia en un punto (r,z) debido a una fuente puntual isotrópica localizada en la posición $(0,z)$ en un medio infinito se describe mediante la ecuación de la difusión, cuya solución para una fuente puntual de 1W de potencia se puede describir como sigue:

$$\phi(r, z_0) = \frac{1}{4\pi D} \frac{\exp(-\mu_{\text{eff}} r_1)}{r_1} \quad (2-53)$$

donde:

$$r_1 = \left[(z - z_0)^2 + r^2 \right]^{1/2} \quad (2-54)$$

Para un medio semi-infinito las condiciones de frontera deberán especificarse. Si el índice de refracción del tejido se acopla con el del medio externo entonces la condición de frontera es aquella donde el flujo difuso total dirigido hacia adentro del medio es cero, ecuación 2-37, que en función del coeficiente de difusión D puede escribirse como sigue:

$$\phi(\mathbf{r}_s) - 2D \frac{\partial}{\partial n} \phi(\mathbf{r}_s) = 0 \quad (2-55)$$

Esta condición se satisface aproximadamente colocando el ritmo de fluencia $\phi(\mathbf{r})$ igual a cero sobre una frontera extrapolada para un peso aproximado igual a $2D$ sobre la superficie real del tejido.

Si el índice de refracción del tejido es diferente al del medio externo la condición de frontera deberá cambiarse para permitir reflexiones internas en la superficie del mismo. Keizer *et al.* [9] demostraron que para estas interfases la condición de frontera se puede escribir como:

$$\phi(\mathbf{r}_s) - 2AD \frac{\partial}{\partial n} \phi(\mathbf{r}_s) = 0 \quad (2-56)$$

donde A está relacionado con las reflexiones internas y se puede obtener a

partir de los coeficientes de reflexión de Fresnel. Sin embargo, como un método alternativo a éste, el valor del parámetro A pudo ser determinado empíricamente por Groenhuis *et al.* [10] según la siguiente relación:

$$A = \frac{(1+r_i)}{(1-r_i)} \quad (2-57)$$

donde $r_i = 0.668 + 0.0636n_{rel} + 0.710n_{rel}^{-1} - 1.440n_{rel}^{-2}$, y $n_{rel}=n_t/n$ (2-58)

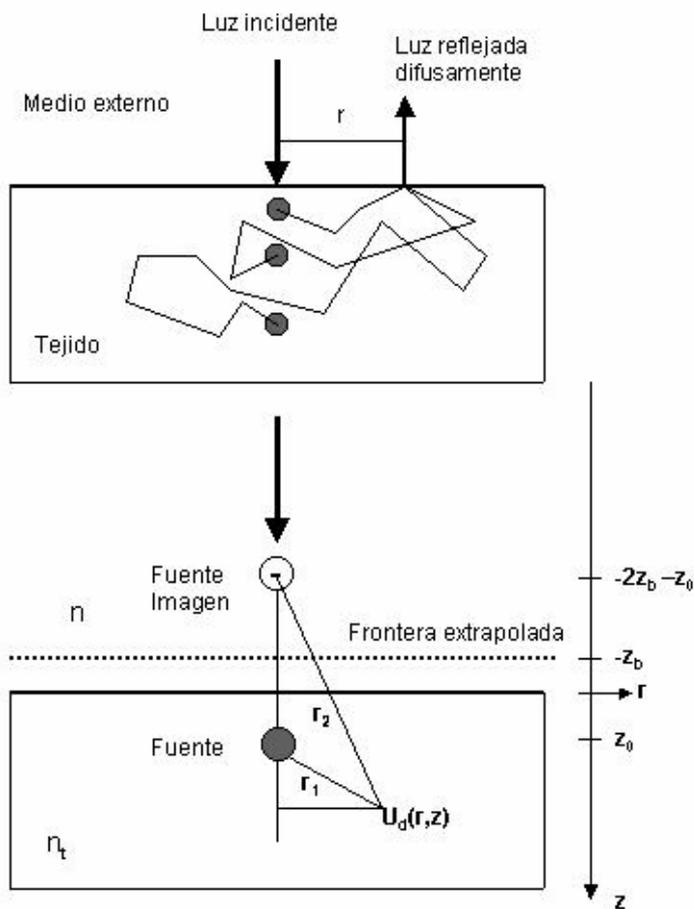


Figura 2.5 (superior) Centros de esparcimiento a lo largo del eje z, que representan fuentes puntuales isotrópicas en la ecuación de la difusión y luz reflejada difusamente a la distancia r de un haz de luz con incidencia normal a la superficie de un tejido homogéneo y semi-infinito. (inferior) Posición de la fuente imagen negativa, de una fuente puntual que se encuentra a una profundidad $z_0=1/\mu_{tr}$, con relación a la frontera extrapolada en $z_b=-2AD$ y a la frontera real del tejido en $-(2z_b+z_0)$.

Luego la condición de frontera expresada por (2-56) se satisface colocando el ritmo de fluencia igual a cero sobre una frontera extrapolada para un peso aproximado igual a $2AD$ sobre la superficie del tejido.

El ritmo de fluencia debido a una fuente puntual de esparcimiento isotrópico dentro del medio semi-infinito, se puede forzar a que sea cero sobre un plano introduciendo una fuente imagen negativa, tal como se ilustra en la parte inferior de la figura 2.5, de tal manera que para una fuente colocada a una

profundidad $z_0 = \frac{1}{\mu_{tr}}$ de la superficie del tejido, la distancia a la frontera

extrapolada sea de z_0+z_b , por lo tanto la fuente imagen deberá estar colocada a la distancia z_0+z_b con respecto a la frontera extrapolada. De esto último se deduce que la fuente imagen estará colocada a la distancia z_0+2z_b de la superficie del tejido.

A la magnitud z_0 se le conoce en la literatura como camino libre medio de transporte (mfp').

Esta situación así planteada permite que la intensidad difusa promedio para una fuente puntual en un medio semi-infinito sea calculada como la suma de la intensidad difusa promedio de la fuente y su imagen en un medio infinito, siendo la solución dada por la ecuación (2-53) como:

$$\phi(r, z_0) = \frac{1}{4\pi D} \left(\frac{\exp(-\mu_{eff} r_1)}{r_1} - \frac{\exp(-\mu_{eff} r_2)}{r_2} \right) \quad (2-59)$$

$$\text{donde: } r_2 = \left[(z + z_0 + 2z_b)^2 + r^2 \right]^{1/2} \quad (2-60)$$

Pero lo que realmente nos interesa es la luz reflejada difusamente $R_d(r)$, que escapa de la superficie del tejido ($z=0$) a la distancia r , ésta es conocida como reflectancia difusa lateral o radial y matemáticamente se expresa de manera muy similar a la 1^{ra} ley de Fick como sigue:

$$R_d(r) = -D \nabla \phi(r, z) \Big|_{z=0} \quad (2-61)$$

Si las ecuaciones (2-59) y (2-61) se combinan se obtiene la reflectancia difusa en la superficie del tejido como:

$$R_d(r) = \frac{1}{4\pi} \left[z_0 \left(\mu_{\text{eff}} + \frac{1}{r_1} \right) \frac{e^{-\mu_{\text{eff}} r_1}}{r_1^2} + (z_0 + 2z_b) \left(\mu_{\text{eff}} + \frac{1}{r_2} \right) \frac{e^{-\mu_{\text{eff}} r_2}}{r_2^2} \right] \quad (2-62)$$

donde r_1 y r_2 están dadas por las ecuaciones (2-54) y (2-60), que para $z=0$, quedarán expresadas como:

$$r_1 = [z_0^2 + r^2]^{1/2} \text{ y } r_2 = [(z_0 + 4AD)^2 + r^2]^{1/2} \quad (2-63)$$

Si definimos al coeficiente de profundidad óptica como:

$$\delta = \sqrt{\frac{D}{\mu_a}} \quad (2-64)$$

la ecuación (2-62) podrá expresarse igualmente como:

$$Rd(r) = \frac{1}{4\pi} \left[z_0 \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r_1} \right) \frac{e^{-\frac{r_1}{\delta}}}{r_1^2} + (z_0 + 4AD) \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r_2} \right) \frac{e^{-\frac{r_2}{\delta}}}{r_2^2} \right] \quad (2-65)$$

La reflexión difusa total Rd es una magnitud muy utilizada de cuya medición se pueden extraer los coeficientes de esparcimiento reducido y de absorción del tejido de estudio, como se verá con más detalle en el Capítulo 4 de la tesis. Esta magnitud se calcula integrando la reflectancia difusa radial sobre la superficie completa del tejido:

$$Rd = \int_0^{\infty} R_d(r) 2\pi r dr = \frac{1}{2} e^{-\frac{z_0}{\delta}} \left(1 + e^{-\frac{4AD}{\delta}} \right) \quad (2-66)$$

El conjunto de las fórmulas (2-56)-(2-66) descritas en este acápite conforman la llamada formulación de Farrell y es la que utilizaremos para describir la forma de la curva de reflectancia obtenida mediante la técnica de Video Reflectometría.

2.5 CONCLUSIONES

Se presentó la teoría del transporte para explicar la interacción de la luz con los tejidos biológicos, obteniéndose la ecuación de transporte radiativa para la intensidad específica. La solución analítica desarrollada para esta

ecuación íntegro-diferencial fue la llamada aproximación de la difusión que, bajo determinadas circunstancias, permitió derivar la ecuación de la difusión en estado estacionario para la intensidad difusa específica promedio; y que junto con las condiciones de fronteras discutidas conforman la descripción matemática completa de la aproximación de la difusión. Se analizó además, el caso particular de la ecuación de la difusión para una fuente puntual isotrópica dentro de un medio infinito, cuya solución se retomó para obtener la reflectancia difusa radial de una fuente puntual isotrópica en un medio semi-infinito.

Por último, se realizaron un conjunto de aproximaciones que permite que el ritmo de fluencia de una fuente puntual en un medio semi-infinito sea calculada como la suma del ritmo de fluencia de la fuente y su imagen en un medio infinito, conocido como formulación de Farrell y es la que emplea la técnica de Video Reflectometría, objetivo fundamental de esta tesis de maestría.

REFERENCIAS

- [1] A. Ishimaru, *Wave propagation and Scattering in Random Media* (Academic Press, 1978).
- [2] A. Ishimaru, "Transport theory of wave propagation in random particles", in *Wave propagation and Scattering in Random Media*, eds (Academic Press, 1978), pp147-160.
- [3] A. Ishimaru, "Scattering and Absorption of a wave bay a single particle", in *Wave propagation and Scattering in Random Media*, eds (Academic Press, 1978), pp 9-12.
- [4] A. Ishimaru, "Diffusion approximation", in *Wave propagation and Scattering in Random Media*, eds (Academic Press, 1978), pp 175-190.
- [5] A. Ishimaru, "Two and four flux theory", in *Wave propagation and Scattering in Random Media*, eds (Academic Press, 1978), pp 191-201.
- [6] S.A. Prahl, "Light Transport in Tissue", (1988), <http://www.bme.ogi.edu/~prahl/pubs/abs/prahl88.html>
- [7] L. G. Henyey and J. L. Greenstein, "Diffuse radiation in the Galaxy", *J. Astrophys*, **93**, 70-83 (1941).
- [8] T. J. Farrell, M. S. Patterson, B. Wilson, "A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties *in vivo*", *Med. Phys.* **19**, 879-888 (1992).
- [9] M. Keijer, W. M. Star, P. R. Storchi, "Optical diffusion in layered media", *App. Opt.* **27**, 1820-1824 (1988).
- [10] R. A. J. Groenhuis, H. A. Ferwerda, J. J. Ten Bosch, "Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 1:Theory", *App. Opt.* **22**, 2456-2462 (1983).

Capítulo 3

Preparación de Tejidos Sintéticos

En este capítulo se presenta una breve introducción a la temática que se refiere a los modelos de tejidos sintéticos (*phantoms*) como simuladores de las propiedades ópticas de los tejidos biológicos, especialmente a la piel, con el propósito de calibrar a la técnica experimental de Video Reflectometría que permite medir esas propiedades. Se hace énfasis en los modelos de tejidos sintéticos descritos en la literatura, basados en el uso de Intralípidos como medio que simula a las propiedades de esparcimiento de la piel, y en las técnicas experimentales frecuentemente empleadas para preparar phantoms con coeficientes de absorción y de esparcimiento controlados. También se describen las características generales de la piel especialmente su estructura, principales elementos de importancia óptica, y propiedades ópticas calculadas a la longitud de onda de 633 nm, según las definiciones reportadas por Jacques en el año 1998 [19]. Finalmente se proponen modelos de tejidos sintéticos que simulen sus propiedades ópticas y el procedimiento o metodología para su diseño.

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Modelos de tejidos sintéticos

Con el surgimiento y desarrollo de las técnicas ópticas tanto para el tratamiento como para el diagnóstico de enfermedades, se comenzaron a desarrollar a finales de la década del 80, modelos sintéticos de tejidos (*phantoms*) para imitar las propiedades ópticas y estructurales de los tejidos biológicos. Estos modelos han sido desarrollados por ejemplo: para la espectroscopia de fluorescencia de los tejidos; para el monitoreo tanto de la oxigenación como de la glucosa; en optoacústica; en mediciones del grado de polarización de la luz por los tejidos; en la detección cuantitativa de fluoróforos (fotosensibilizadores); en investigaciones relacionadas con la implementación terapéutica de la radiación óptica como por ejemplo en la terapia fotodinámica; entre otros [1].

Posteriormente, con la introducción de las distintas técnicas experimentales para determinar las propiedades ópticas de los tejidos biológicos, en muestras de tejidos *in-vivo* o *ex-vivo*, se ha reportado un número importante de distintos tipos de *phantoms*, manteniéndose aún en progreso las investigaciones en este campo.

Atendiendo al propósito con que han sido desarrollados estos modelos de tejidos podemos clasificarlos en las siguientes [1,2]:

1. Validación de modelos físicos y simulaciones.
2. Prueba y optimización del funcionamiento de un arreglo experimental o instrumento específico.
3. Calibración de un instrumento y prueba de la estabilidad y reproducibilidad
4. Comparación entre laboratorios y estandarización

Los tipos de tejidos sintéticos se pueden clasificar en líquidos y sólidos (robustos o gelatinosos), según la clasificación realizada por Alexander B. Pravdin *et al.* [1]. Para el caso de los líquidos la matriz puede ser agua o lípidos, y para el caso de los sólidos pueden ser polímeros, gelatinas, geles

de agar o colágeno, geles de polyacrylamide, resinas de epoxy, silicona, goma, plástico, etc. Los centros de esparcimiento están conformados por lípidos o emulsiones de grasas, como el Intralipid, Nutralipid, Liposyn y la leche. También pueden emplearse como esparcidor microsferas de polímeros; polvo de TiO_2 o Al_2O_3 (preferentemente usados en phantoms de gelatina, y resinas); microsferas de cristales de cuarzo (usados en general en phantoms a base de resinas); etc. Como centros de absorción se emplean colorantes naturales (sangre) y sintéticos (tinta china, azul de metileno, melanina) que pueden ser adquiridos comercialmente con relativa facilidad. Según el objetivo para el que se ha diseñado el phantom, éste tendrá una o varias de las siguientes características [2]:

1. Propiedades de esparcimiento y de absorción dependientes con la longitud de onda semejantes a la del tejido que se pretende estudiar
2. Incorporar moléculas de interés como las fibras de colágeno, fluoróforos, entre otros.
3. Estabilidad de los parámetros ópticos y otras propiedades físicas (humedad, elasticidad) para las condiciones ambientales del laboratorio.
4. Índice de refracción semejante al del tejido a simular.
5. Posibilidad de incorporar regiones con diferentes propiedades ópticas tales como inclusiones imitadores de tumores o capas imitando a la piel.
6. Propiedades mecánicas (superficiales y volumétricas) y térmicas semejantes a las del tejido.

Uno de los tejidos sintéticos comúnmente usado para investigar la propagación de la luz en los tejidos biológicos consiste en el uso de una solución acuosa que contiene un medio graso esparcidor, como por ejemplo las emulsiones de lípidos (Intralípido), y un colorante soluble en agua como la tinta china [3,4]. Este phantom puede ser preparado en concentraciones adecuadas para reproducir las propiedades ópticas de los tejidos biológicos como la piel, debido a que las micropartículas de los lípidos producen un

esparcimiento similar al que producen las llamadas membranas bilípidas de las células y organelos.

Una desventaja de este tipo de phantom es que sus propiedades no se mantienen estables por largo tiempo y en pocos días pueden variar apreciablemente. Por el contrario, un phantom sólido a base de agar tiene más durabilidad, muy baja absorción y muy poca turbidez [5].

Como ya mencionamos en el Capítulo 1, los tejidos sintéticos pueden prepararse a voluntad con propiedades de absorción y de esparcimiento controladas, permitiendo simular la distribución de la luz en los tejidos vivos. En particular, este proyecto de tesis emplea phantoms líquidos, y sólidos a base de agar a los que se les conocen las propiedades ópticas con vista a calibrar nuestra instalación experimental de Video Reflectometría, y verificar los algoritmos de extracción de las propiedades ópticas a partir de la curva de reflectancia.

3.1.2 Parámetros ópticos para el intralípido-10%

En un estudio detallado realizado por van Staveren *et al.*[3], estos autores sugirieron una dependencia aproximada del espectro de esparcimiento (μ_s) y del factor de anisotropía del medio (g) para una suspensión de Intralípido-10% (Kabivitrum, Stockholm), estimando la dimensión y distribución de las partículas esparcidoras con el uso de la microscopía electrónica y la teoría de Mie para calcular las propiedades ópticas.

Las siguientes expresiones aproximadas fueron las encontradas por estos autores:

$$\mu_s(\lambda) = 0.16\lambda^{-2.4} [\text{mL}^{-1} \text{ L cm}^{-1}] \quad (\pm 6\%) \quad (3-1)$$

$$g(\lambda) = 1.1 - 0.58\lambda \quad (\pm 5\%) \quad (3-2)$$

para $0.4 < \lambda < 1.1$, donde la longitud de onda λ se expresa en micrómetros. La unidad $[\text{mL}^{-1} \text{ L cm}^{-1}]$ deberá ser interpretada como cm^{-1} por mililitro de Intralípido-10% por litro de la suspensión total diluida.

Por tanto la ecuación (3-1) nos permite conocer, de manera aproximada, cuál será el coeficiente de esparcimiento para una cierta concentración de Intralípido a una longitud de onda específica.

El Intralípido™ (Kabivitrum, Stockholm), es usado clínicamente como un nutriente administrado al paciente por vía intravenosa, de tal manera que la elaboración de este producto es con fines médicos y por tanto no constituye un estándar óptico. Esto significa que las propiedades ópticas varían entre botellas suministradas por el mismo productor, y aún más entre productos de otras marcas registradas, muy similares en su composición como el Nutralipid™ (Farmacia, Quebec) y el Liposyn™ (Abbot Labs, Montreal). Por tal motivo es que se recomienda verificarlas experimentalmente, encontrándose diferentes valores reportados entre distintos grupos de investigadores [6].

Estos productos contienen aceite de soya, fosfolípidos de yema de huevo y glicerina, siendo las partículas de grasa dispersadas en el agua aproximadamente esféricas. En particular, para el Intralípido usado por van Staveren *et al.*, el diámetro promedio de ellas fue de 97 nm, la densidad de partículas en la suspensión fue de $3.97 \times 10^{19} \text{ m}^{-3}$ y el coeficiente de absorción (μ_a) para la longitud de onda de 633 nm fue de $1.69 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

A continuación se lista los constituyentes que conformaron a ese Intralípido de acuerdo al productor [3,6]: para una botella de 500 mL (10% de lípidos indica 10 g de éstos por cada 100 mL de suspensión): 50 g de aceite de soya, 6 g de fosfolípidos de huevo, 11.25 g de glicerol, y 430.5 g de agua.

3.1.3 La tinta china como absorbente óptico

En los modelos de tejidos sintéticos líquidos que utilizan al agua como la matriz para disolver al Intralípido simulando un coeficiente de esparcimiento específico, la absorción de éstos es debido principalmente al agua en las longitudes de onda correspondiente al espectro visible e infrarrojo cercano, y es suficientemente baja como para ser ignorada [2], por ejemplo para $\lambda=633$

nm, $\mu_a=0.00292 \text{ cm}^{-1}$, según la interpolación que fue realizada con los datos suministrados en el sitio web [7] correspondiente al espectro de absorción del agua medido por Hale y Querry [8]. Por esta razón se añade una sustancia fuertemente absorbente para imprimirle al phantom un coeficiente de absorción semejante al tejido que se simule.

Un tipo de colorante comúnmente empleado para estas simulaciones es la tinta china [4,5] la cual se usa a distintas concentraciones y resulta tener un espectro de absorción aproximadamente plano [2]. El coeficiente de absorción de estas soluciones se determina con un espectrofotómetro comercial. En el momento en que fue realizado este trabajo, no se disponía de los accesorios adecuados para medir el coeficiente de absorción con el espectrofotómetro disponible en nuestro laboratorio, por lo que no fue posible añadirle a los phantoms elaborados, un coeficiente de absorción semejante a los reportados para la piel.

3.1.4 Índice de refracción del tejido sintético

El índice de refracción promedio de un tejido biológico se define [9] como:

$$\bar{n} = f_s * n_s + (1 - f_s) * n_0 \quad (3-3)$$

donde f_s es la fracción volumétrica del componente esparcidor, n_s su índice de refracción y n_0 el índice de refracción de la materia básica.

El índice de refracción de la materia básica para los tejidos biológicos aparece reportado entre los valores de 1.35-1.37 [9].

Por ejemplo, para un tejido sintético líquido conformado por H_2O más una concentración determinada de Intralípido-10%, el índice de refracción promedio del phantom (n_{ph}) podrá ser calculado como:

$$\bar{n}_{ph} = \left(\frac{V_{int}[\text{mL}]}{V_{ph}[\text{L}]} \right) * n_{int} + \left(1 - \frac{V_{int}[\text{mL}]}{V_{ph}[\text{L}]} \right) * n_{H_2O} \quad (3-4)$$

donde V_{ph} es el volumen del phantom, V_{int} es el volumen del Intralípido, n_{int} y n_{H_2O} es el índice de refracción del Intralípido y del agua, respectivamente.

El índice de refracción del Intralípido, se calcula a través de la siguiente fórmula de dispersión [3]:

$$n(\lambda) = 1 + \frac{J}{\lambda^2} + \frac{K}{\lambda^4} \quad (3-5)$$

donde $n_{\text{aceite-soya}}=1.451$, $n_{\text{agua}}=1.311$; $J=1.154 \times 10^4$, $K=-1.132 \times 10^9$, y la longitud de onda, λ , expresada en nanómetros.

3.2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA DETERMINAR PROPIEDADES ÓPTICAS

Tal como se mencionó en el Capítulo 1, entre las técnicas que permiten determinar a uno de los parámetros ópticos del tejido *in-vitro*, se encuentra el método de transmisión colimada y conjuntamente con el método de absorbente añadido se pueden conocer las propiedades ópticas del tejido que se simula: μ_a , μ_s , y g , con la desventaja de que sólo es aplicable a tejidos sintéticos líquidos.

A continuación se describen brevemente ambas técnicas de medición, generalmente empleadas para preparar tejidos sintéticos con propiedades de absorción y de esparcimiento controladas.

3.2.1 Método de transmisión colimada

Este método se fundamenta en la medición de la luz colimada que se transmite a través de una muestra de tejido sintético muy próximo al eje de transmisión. Esta porción de luz transmitida es una mezcla de la luz esparcida, no esparcida, y absorbida, de tal modo que el cociente entre ésta medición y la luz que incide inicialmente es la transmisión colimada (T_{col}).

Esta medición es realmente difícil de realizar por lo que la instalación experimental que se diseñe debe ser capaz de medir niveles muy bajos de luz [10].

Usando la ley de Lambert-Beer se logra medir el coeficiente de atenuación total como:

$$\mu_t = -\frac{1}{d} \ln(T_{col}) \quad (3-6)$$

Si el tejido se diseña para bajas concentraciones de sus componentes se cumple la siguiente relación [3-4,11]:

$$\mu_t = -\frac{1}{c*d} \ln(T_{col}) \quad (3-7)$$

donde c es la concentración definida como la fracción volumétrica del componente esparcidor y d es el diámetro de la cubeta. Se recomienda graficar los valores medidos contra la concentración o espesor de la muestra de modo que si no se obtiene una línea recta, la instalación experimental no está diseñada correctamente [10], siendo por lo tanto la pendiente de la mejor recta que ajusta a los datos experimentales, el coeficiente de atenuación total μ_t .

Para los medios de muy bajo albedo (W_0) (ver Capítulo 2), donde $\mu_a \gg \mu_s$, y bajo esta condición, la transmisión colimada permite calcular el coeficiente de absorción. Para ésta medición en particular es suficiente que la muestra sea uniforme en composición y espesor y que el sistema de detección que se utilice se coloque en una posición fija, de modo que el coeficiente de absorción sea medido como:

$$\mu_a = -\frac{1}{c*d} \ln(T_{col}) \quad (3-8)$$

Para el caso contrario, en que el esparcimiento sea dominante sobre la absorción, entonces la pendiente determina el valor de μ_s .

Si la luz está perfectamente colimada, y la porción de la luz esparcida se distribuye isotrópicamente, se puede realizar una instalación experimental que persiga medir el coeficiente de atenuación total, específicamente el coeficiente de esparcimiento para un medio altamente esparcidor. Instalaciones experimentales típicas para tal objetivo se describen en las referencias [3-4,10-12].

3.2.2 Método de absorbente añadido

Este método se fundamenta en la solución de la ecuación de la difusión en la aproximación de la difusión, para una fuente puntual en un medio infinito, (Capítulo 2). Rescribamos la relación 2-52 como:

$$\phi(r) = \frac{B}{r} * \exp(-\mu_{\text{eff}} r) \quad (3-9)$$

$$\text{donde } B = \frac{P_0}{4\pi D}$$

La técnica experimental consiste en determinar el coeficiente de absorción y de esparcimiento reducido (o factor de anisotropía) de un medio altamente esparcidor (por ejemplo una suspensión acuosa de Intralipido-10%), si se le añade controladamente una solución de un colorante puramente absorbente conociendo de antemano su coeficiente de absorción, y asumiendo que no afecta a las propiedades de esparcimiento del medio turbio [11-12].

Midiendo el ritmo de fluencia $\phi(r)$ de una fuente de luz isotrópica inmersa en la suspensión acuosa, en función de la distancia r entre la fuente luminosa y un detector inmerso, también isotrópico [3], se puede calcular al coeficiente de atenuación efectivo μ_{eff} (ecuación 2-47), como el valor absoluto de la pendiente del ajuste lineal del $\ln[\phi(r) * r]$ Vs r , a partir de (3-9).

Mediciones análogas se realizan, al añadirle a ese medio la solución de una sustancia absorbente y calcular por tanto a los parámetros ópticos μ_a y μ_s' a través de μ_{eff} , como explicaremos brevemente en los párrafos que siguen.

Rescribamos al coeficiente de atenuación efectivo como:

$$\mu_{\text{eff}}^2 = 3\mu_a [\mu_a + \mu_s'] \quad (3-10)$$

Este sería el calculado sin absorbente añadido. Al adicionarle la solución del colorante con μ_a conocido, entonces μ_{eff}^2 quedará expresada como:

$$\mu_{\text{eff}}^2 = 3(\mu_a + \mu_{\text{ac}})[\mu_a + \mu_{\text{ac}} + \mu_s'] \quad (3-11)$$

donde μ_{ac} es el coeficiente de absorción de la solución del colorante. Como se puede observar se cuenta con dos ecuaciones y con dos incógnitas, para

lo cual se determinan tanto al coeficiente de esparcimiento reducido como el coeficiente de absorción del medio esparcidor.

Instalaciones experimentales típicas se pueden encontrar en las referencias [3, 10-12].

3.3 CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS GENERALES DE LOS MEDIOS BIOLÓGICOS: LA PIEL

El agua es el compuesto químico más abundante del cuerpo humano, representando en el hombre adulto el 65% de su peso corporal. A nivel celular se distribuye en tres partes: agua intracelular, con un 55%; agua extracelular, con un 20%; y agua intercelular, donde casi toda se conserva en forma de gel [13-14].

Como se puede inducir, las propiedades ópticas de los tejidos quedarán definidas en gran parte por las propiedades ópticas del agua, cuyo coeficiente de absorción es dependiente de la longitud de onda, y especialmente para $\lambda=633$ nm, que es donde se realizan nuestras mediciones, es de 0.00292 cm^{-1} , según se explicó en el acápite 3.1.3.

La sangre, otro de los principales constituyentes de los tejidos biológicos, está compuesta por plasma y células. El Plasma a su vez está formado por sales y compuestos orgánicos, como grasas, lípidos y glucosas, en tanto las células están formadas por los eritrocitos o células rojas (contienen la hemoglobina), los leucocitos o células blancas y las plaquetas [15].

En general, los tejidos biológicos se distinguen por su alto grado de inhomogeneidad, que conjuntamente con las distintas dimensiones y composición de los elementos celulares, con índices de refracción diferentes al de la materia básica (matriz homogénea formada por los constituyentes del tejido intercelular y extracelular), definen el proceso de esparcimiento de la radiación óptica por los tejidos [9].

3.3.1 Estructura de la piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y está compuesta por tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis, como se observa en la figura 3.1, [16].

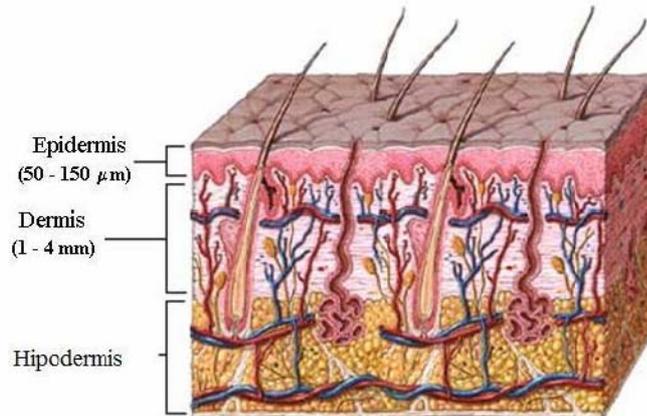


Figura 3.1 Imagen de las capas de la piel. Tomado de la Enciclopedia Médica en línea [16].

La epidermis está formada por cuatro subcapas (córnea, granulosa, espinosa y basal) que dependen de las características de los queratinocitos (células primordiales de la piel) y que son reemplazados por medio de la mitosis de las células basales. Su epitelio está en constante renovación y no posee vasos sanguíneos. Esta capa de la piel también contiene células con pigmentos llamadas melanocitos, que producen la melanina (responsables del color de la piel) la cual se almacena en un orgánulo citoplasmático llamado melanosoma con dimensiones aproximadas de (100 x 0.7) nm [16-17].

La dermis es el tejido de soporte de la epidermis y de los anexos cutáneos. En ella se localizan los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. En esta capa de la piel abundan las fibras de colágeno y elásticas que se disponen de forma paralela y que le dan a la piel la consistencia y elasticidad característica del órgano. Se presenta en fibrillas entrelazadas de 20 a 100 nm en todos los planos del espacio de un modo muy apretado, y se agrupan

para formar fibras de colágenos mayores que son sintetizados fundamentalmente por las células fibroblastos [16-17].

Y por último la hipodermis, conocida también como tejido subcutáneo o aponeurosis superficial, está compuesta por tejido conjuntivo laxo, formada por una capa variable de tejido adiposo (célula grasa) limitado por tabiques de fibras colágenas delgadas y escasas fibras elásticas [17-18].

3.3.2 Propiedades ópticas de la piel

Como ya se explicó en el acápite 3.3, el proceso de esparcimiento de la radiación óptica por los tejidos está determinado por las inhomogeneidades propias de las células, influyendo el hecho de que las dimensiones de éstas y sus elementos celulares (núcleo, citoplasma, membrana celular, vacuolas, entre otros) sean comparables o no con la longitud de onda de la radiación que se propaga. El tipo de esparcimiento que ocurre en el tejido por tanto se corresponde con las dimensiones propias de los elementos esparcidos, quedando explicado usando la conocida teoría de Mie o de Rayleigh. Ejemplo de ello son las fibras de colágeno que presentan tanto esparcimiento de Mie como de Rayleigh [19].

Además del agua (según la longitud de onda de la radiación incidente), la melanina es el elemento absorbente principal en la epidermis y la sangre en la dermis (específicamente la oxihemoglobina y la hemoglobina reducida) en la región del espectro electromagnético visible e infrarrojo cercano.

Un punto de partida aproximado para describir la óptica de la piel de cualquier individuo adulto y sano en particular, es reportado y discutido por Jacques en el año 1998 [19] en donde presenta cómo elegir los coeficientes ópticos aproximados para la absorción y el esparcimiento reducido de la piel con cantidades variables de la melanina y de la sangre. Nosotros usaremos esas definiciones y comentarios, en los párrafos que siguen, para calcular al coeficiente de esparcimiento reducido de la piel en la longitud de onda de 633 nm.

Coefficiente de absorción en la epidermis y en la dermis

La expresión analítica para el coeficiente de absorción total de la epidermis, se define a través de la expresión siguiente:

$$\mu_{aE}(\lambda) = f_{me} * \mu_{ame}(\lambda) + (1 - f_{me}) * \mu_{abase}(\lambda) \quad (3-12)$$

donde:

f_{me} es la fracción volumétrica de melanosomas.

$\mu_{ame}(\lambda)$ es el coeficiente de absorción promedio del interior de un melanosoma.

$\mu_{abase}(\lambda)$ el coeficiente de absorción básico de la epidermis.

Es difícil distinguir los valores del coeficiente de absorción básico asociados a la epidermis en ausencia de melanina y a la dermis en ausencia de sangre, de modo que éste se considera semejante tanto para la epidermis como para la dermis y se expresa como:

$$\mu_{abase}(\lambda) = 0.244 + 85.3 * e^{-(\lambda-154)/66.2} \quad (3-13)$$

En tanto el coeficiente de absorción de los melanosomas se determina por:

$$\mu_{ame}(\lambda) = \frac{6.6 * 10^{11}}{\lambda^{3.33}} \quad (3-14)$$

Calculando el coeficiente de absorción total de la epidermis a través de la expresión (3-12) en $\lambda=633$ nm, para una piel ligeramente pigmentada ($f_{me}=10\%$), éste es aproximadamente igual a 31 cm^{-1} .

La expresión analítica para el coeficiente de absorción total de la dermis, queda determinada a través de la expresión siguiente:

$$\mu_{aD}(\lambda) = f_{bl} * [S * [\mu_a(\lambda)\text{HbO}_2] + (1 - S) * [\mu_a(\lambda)\text{Hb}]] + (1 - f_{bl}) * \mu_{abase}(\lambda) \quad (3-15)$$

donde:

f_{bl} es la fracción volumétrica de sangre (consideramos igual a 0.2%, que significa un contenido típico de sangre distribuida uniformemente en la dermis).

$\mu_a(\lambda)$ es el coeficiente de absorción de la sangre.

S es la saturación del oxígeno.

Como ya explicamos anteriormente, el elemento absorbente principal en la dermis de la piel sana es la sangre, especialmente la oxihemoglobina (HbO_2) y la hemoglobina reducida (Hb). El coeficiente de absorción en función de la longitud de onda para estas dos moléculas, aparece reportado por Jacques en la referencia [19].

Determinando el coeficiente de absorción de la sangre en $\lambda=633$ nm y teniendo en cuenta una saturación del oxígeno igual a 90/100, el coeficiente de absorción total de la dermis (3-15) es aproximadamente igual a 0.40 cm^{-1} .

Coeficiente de esparcimiento en la epidermis y en la dermis

Al proceso de esparcimiento en la piel contribuyen principalmente las fibras cilíndricas de colágeno grandes y pequeñas.

El coeficiente de esparcimiento total de la dermis se calcula por la expresión:

$$\mu_{sD}(\lambda) = \frac{\mu'_{sm}(\lambda) + \mu'_{sR}(\lambda)}{1 - g(\lambda)} \quad (3-16)$$

donde:

$\mu'_{sm}(\lambda)$ es el coeficiente de esparcimiento reducido debido a las fibras de colágeno grandes.

$\mu'_{sR}(\lambda)$ es el coeficiente de esparcimiento debido a las fibras de colágeno pequeñas.

$g(\lambda)$ es el factor de anisotropía de la dermis, que para la longitud de onda de 633 nm es aproximadamente igual a 0.8.

Las siguientes expresiones para el coeficiente de esparcimiento reducido debido a las fibras de colágeno grandes y pequeñas, fueron obtenidas por Jacques [20], aplicando la teoría de Mie para cilindros y esferas de 100 nm de diámetros respectivamente, quedando expresadas por:

$$\mu'_{sm}(\lambda) = \frac{2.0 * 10^5}{\lambda^{1.5}} \quad (3-17)$$

$$\mu'_{sR}(\lambda) = \frac{2.0 * 10^{12}}{\lambda^4} \quad (3-18)$$

La epidermis, con sus fibras de queratinas, tiene un comportamiento semejante al de la dermis, y μ'_s de la epidermis es tentativamente aproximadamente igual a μ'_s de la dermis.

Realizando los cálculos correspondientes a partir de la ecuación (3-16) el coeficiente de esparcimiento de la dermis (o epidermis) es aproximadamente igual a 127 cm^{-1} , y por consiguiente el coeficiente de esparcimiento reducido es de 25 cm^{-1} .

3.4 DESCRIPCION DE LOS MODELOS DE TEJIDOS SINTETICOS USADOS

En este trabajo se usaron tanto tejidos sintéticos líquidos, como sólidos a base de agar, usando el intralípido (IVELIP-10% y el LIPOFUNDIN-10%) como sustancia que le brinda al medio las propiedades de esparcimiento. Además, con el objetivo de caracterizar la repetibilidad de adquisición de la curva de reflectancia difusa con nuestro arreglo experimental [21] se incluyó la leche comercial (Alpura Light 2000, por su bajo costo y semejanza con los dos anteriores) y un volumen cilíndrico de Teflón.

Es importante enfatizar que para el cálculo de los parámetros ópticos de los phantoms preparados en este trabajo de tesis asumimos como válidas las relaciones (3-1) y (3-2).

3.4.1 Procedimiento usado para el diseño de tejidos sintéticos líquidos

El coeficiente de esparcimiento reducido fue determinado para cuatro contenedores cilíndricos cuyo volumen total fue de 112 ml, habiendo prefijado el volumen del esparcidor a 4 valores: 15, 20, 25 y 30 ml del Intralípido-10%.

Calculando previamente al coeficiente de esparcimiento reducido de la piel, tal como se describió en el acápite 3.3, a la longitud de onda de 633 nm, encontramos que μ_s' de la dermis es aproximadamente igual a 25 cm^{-1} .

Como se pretende preparar un phantom cuyo volumen es V_{ph} , y con un coeficiente de esparcimiento reducido conocido, μ_s' , a la longitud de onda de $0.633 \mu\text{m}$, la cantidad de mililitros necesarios de Intralípido-10% (V_{int}) se puede determinar en forma genérica como sigue:

$$\mu_s(\lambda) = 0.16\lambda^{-2.4} \text{ [mL}^{-1} \text{ L cm}^{-1}] \quad (3-1)$$

$$g(\lambda) = 1.1 - 0.58\lambda \quad (3-2)$$

Como se ha explicado anteriormente, el coeficiente de esparcimiento del phantom es aproximadamente proporcional a la concentración:

$$\mu_s(\text{phantom}) = \mu_s(\lambda) * c \quad (3-19)$$

donde c se define como [3] $c = \frac{V_{int}[\text{ml}]}{V_{ph}[\text{L}]} \quad (3-20)$

luego entonces:

$$\mu_s(\text{phantom}) = \mu_s(\lambda) * \frac{V_{int}[\text{ml}]}{V_{ph}[\text{L}]} \quad (3-21)$$

Por otra parte, despejando de la ecuación (2-44) a μ_s (Capítulo 2), éste será igual a:

$$\mu_s(\text{phantom}) = \frac{\mu_s'}{(1-g)} \quad (3-22)$$

Igualando (3-21) con (3-22), y despejando a V_{int} , se obtiene entonces que:

$$V_{int}[\text{ml}] = \frac{\mu_s'}{(1-g) * \mu_s(\lambda)} * V_{ph}[\text{L}] \quad (3-23)$$

3.4.2 Procedimiento usado para el diseño de tejidos sintéticos sólidos

La matriz del tejido sintético sólido se preparó con polvo de agar altamente purificado (Merck Chemicals, [22]), y mediante el procedimiento descrito en el acápite anterior, se determinó el coeficiente de esparcimiento reducido a las mismas proporciones del Intralípido-10% usadas para el phantom líquido.

La matriz se elaboró siguiendo el trabajo de Cubeddu *et al.* [5] aplicado a un volumen total de 470 ml de agua destilada, en los que se tuvo en cuenta una pérdida de 22 ml por evaporación. Una cantidad de 4.48 g de agar fue diluida previamente en una fracción (74 ml) del volumen total de agua destilada. La cantidad remanente de éste (404 ml) se vertió en un beaker y se puso a calentar hasta que alcanzó el punto de ebullición, momento en que fue retirada del calentamiento hasta que enfrió 10 °C, instante en que se le añadió la solución de agar. Este contenido fue agitado manualmente (y suavemente) alrededor de 10 segundos e inmediatamente puesto a calentar en la parrilla (Cimarec) con agitación variable de aproximadamente 90 rpm, hasta que alcanzó la temperatura de ebullición manteniéndola en estado de evaporación durante 2 minutos, garantizando así que se disuelvan todas las partículas de agar. El beaker fue retirado del calentamiento, hasta que alcanzó la temperatura de 70 °C.

La matriz de agar fue vertida en cada contenedor plástico hasta que la mezcla entre éste y el Intralipido-10% alcanzara el nivel de 112 ml. Para lograr la homogeneidad de cada mezcla, éstas fueron agitadas manualmente hasta que su temperatura descendió aproximadamente a 50 °C y finalmente dejada a enfriar a la temperatura del medio ambiente (22 °C) hasta que solidificó (aproximadamente en 2 horas).

3.5 CONCLUSIONES

En la literatura especializada se han reportado un número importante de distintos tipos de modelos de tejidos sintéticos, y aún se mantiene en desarrollo esta temática. De ellos destacamos a los que utilizan al Intralípido como medio simulador de las propiedades de esparcimiento de la piel y a la tinta china como medio simulador de las propiedades de absorción.

En este trabajo de tesis se usan los modelos de tejidos sintéticos con el propósito de calibrar un arreglo experimental de Video Reflectometría.

Se presentó la dependencia aproximada del espectro de esparcimiento (μ_s) y del factor de anisotropía del medio (g) para una suspensión de Intralípido-10%, las cuales fueron usadas para calcular en una primera aproximación, las propiedades ópticas del modelo de tejido con propiedades ópticas definidas a voluntad.

Se han propuesto y elaborado tejidos sintéticos tanto líquidos, como sólidos a base de agar, con propiedades de esparcimiento semejantes a las de la piel humana demostrándose el dominio del procedimiento o metodología para su diseño y elaboración.

REFERENCIAS

- [1] Valery V. Tuchin, "Tissue Phantoms", in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, eds (SPIE Press, 2002), pp 311-351.
- [2] Brian W. Pogue and Michael S. Patterson. "Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry", *Journal of Biomedical Optics* **11**, 1-16 (2006).
- [3] Hugo J. van Staveren, Christian J. M. Moes, Jan van Marle, Scott A. Prahl, and Martin J. C. van Gemert, "Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm", *Appl. Opt.* **30**, 4507-4514 (1991).
- [4] Steen J. Madsen, Michael S. Patterson and Brian C. Wilson. "The use of India ink as an optical absorber in tissue-simulating phantoms", *Phys. Med. Biology* **37**, 985-993 (1992).
- [5] Rinaldo Cubeddu, Antonio Pifferi, Paola Taroni, Alessandro Torricelli and Gianluca Valentini, "A solid tissue phantom for photon migration studies", *Phys. Med. Biology* **42**, 1971-1979 (1997).
- [6] S. L. Jacques, "Optical properties of "IntralipidTM", an aqueous suspension of lipid droplets", (1998), <http://omlc.ogi.edu/spectra/intralipid/>
- [7] S. A. Prahl, Oregon Medical Laser Center Website, <http://omic.ogi.edu>
- [8] G. M. Hale and M. R. Querry, "Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region," *Appl. Opt.* **12**, 555-563, (1973).
- [9] Valery Tuchin, "Introduction to Light Scattering by Biological Objects", in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, eds (SPIE Press, 2002), pp 31-167.
- [10] S. Prahl "Optical Property Measurements using the Inverse Adding-Doubling Program", (1995), http://omlc.ogi.edu/pubs/pdf/man_iad.pdf
- [11] C. J. M. Moes, M. J. C. van Gemert, W. M. Star, J. P. A. Marijnissen, and S. A. Prahl, "Measurements and calculations of the energy fluence rate in a scattering and absorbing phantom at 633 nm," *Appl. Opt.* **28**, 2292- 2296 (1989).

- [12] I. Drive, J. W. Feather, P. R. King, and J. B. Dawson, "The optical properties of aqueous suspensions of Intralipid, a fat emulsion", *Phys. Med. Biol.* **34**, 1927-1930 (1989).
- [13] "Importancia del agua en el cuerpo humano" (2005), <http://es.geocities.com/bonidavi/nueva/nutri5.html>
- [14] "Curso: Introducción a la nutrición", Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación, (2008), <http://www.mailxmail.com/curso/excelencia/nutricion/capitulo22.htm>
- [15] D. Tagliasacchi and G. Carboni, "Let's observe the blood cells", (1997), http://www.funsci.com/fun3_en/blood/blood.htm#contents
- [16] A.D.A.M.S Inc., Medline Plus, Enciclopedia médica en español, (2008), http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/8912.htm
- [17] "Anatomía de la piel", en IQB, la web de Med Ciclopedia (Diccionario Ilustrado de Términos Médicos), (2005), <http://www.iqb.es/dermatologia/atlas/anatomia/celulas/celulas.htm>
- [18] "La piel", (2003), http://www.trainermed.com/zzz_atlas_la_piel.htm
- [19] S. L. Jacques, "Skin Optics", (1998), <http://omlc.ogi.edu/news/jan98/skinoptics.html>
- [20] S.L. Jacques, "Origins of Tissue Optical Properties in the UVA, Visible, and NIR Regions," OSA TOPS on Advances in Optical Imaging and Photon Migration, Vol. 2, pp. 364-369, eds. RR Alfano, JG Fujimoto, publ. Optical Society of America, 1996.
- [21] M. Cunill, J. Castro, S. Vázquez, J. A. Delgado, "Implementing and Characterizing a Video Reflectometry Set-up", In *RIAO/OPTILAS 2007: 6th Ibero-American Conference on Optics (RIAO); 9th Latin-American Meeting on Optics, Lasers and Applications (OPTILAS)*; DOI:10.1063/1.2926941; AIP Conf. Proc. 992; April 15, 2008, pp.632-637.
- [22] 101614: Agar-agar, granulated, purified and free from inhibitors for microbiology, <http://www.merck-chemicals.com/chemdat/>

Capítulo 4

Instrumentación

En este capítulo presentamos la implementación de una instalación experimental de Video Reflectometría para determinar las propiedades ópticas en tejidos sintéticos preparados por nosotros y usados para calibrar nuestro arreglo experimental. Mediante el registro de la distribución lateral de la luz reflejada difusamente y en combinación con el modelo teórico de la interacción luz-tejido, en la aproximación de la difusión, se determinan los parámetros ópticos μ_a y μ_s' en muestras de tejidos homogéneos y con geometría semi-infinita. En general esta técnica determina estas propiedades si se realiza además la medición de la reflexión difusa total de la luz por la muestra del tejido.

Se describen también los algoritmos computacionales desarrollados en MATLAB®R2006a para construir la curva de reflectancia y los relacionados con la obtención de los parámetros ópticos a partir de la medición de la reflexión difusa total.

Se considera además, el procedimiento del ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales con el modelo analítico de Farrell et al. [1] para recuperar los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} del tejido sintético. Con el propósito de evaluar este procedimiento durante la calibración del arreglo experimental se muestran los algoritmos elaborados que generan curvas de reflectancia con datos simulados.

Finalmente se propone una instalación experimental para verificar la linealidad de la cámara CCD en la región roja del espectro electromagnético debido a que en dependencia del comportamiento lineal o no de la cámara CCD en el intervalo de flujos de entrada a la misma será más o menos complejo el algoritmo para recuperar los parámetros ópticos en nuestra instalación.

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE VIDEO REFLECTOMETRÍA

La reflectancia difusa resuelta espacialmente es una técnica muy usada fundamentalmente por ser no invasiva y las mediciones en tiempo real de los dos parámetros ópticos, μ_a y μ_s' , se pueden obtener tanto en muestras *in-vivo* como *in-vitro*. Ésta se puede implementar mediante la denominada Video Reflectometría [2].

La Video Reflectometría utiliza una cámara CCD como sistema de detección y algoritmos computacionales que permiten estudiar la distribución lateral de la luz esparcida por el tejido $R_d(r)$, y determinar sus parámetros ópticos. Si alternativamente se realiza una medición auxiliar de la reflectancia difusa total, R_d , con relación a un estándar difuso, también se puede obtener el coeficiente de absorción y de esparcimiento reducido del tejido biológico de interés.

Para utilizar adecuadamente esta técnica, el tejido debe ser considerado homogéneo y semi-infinito y aplicar el modelo del dipolo propuesto por Farrell et al. [1] basado en la aproximación de la difusión (Capítulo 2) cuya expresión matemática resulta adecuada para explicar la distribución de la luz en el tejido. Usando este modelo, se computa la expresión analítica para la distribución lateral $R_d(r)$ (2-65) obtenidas por estos autores.

Uno de los objetivos específicos de este trabajo de tesis fue implementar un arreglo experimental de una instalación de Video Reflectometría similar a la propuesta por Jaques et al. [2] con la diferencia que determinamos los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} usando las técnicas convencionales para resolver problemas de ajuste de mínimos cuadrados no lineales.

4.2 ARREGLO EXPERIMENTAL IMPLEMENTADO

La instalación experimental de Video Reflectometría, implementada en nuestro laboratorio, se muestra en la figura 4.1 [3]; con ella se obtiene el registro de la distribución lateral de la luz $R_d(r)$, en un tejido sintético líquido

como se describe a continuación:

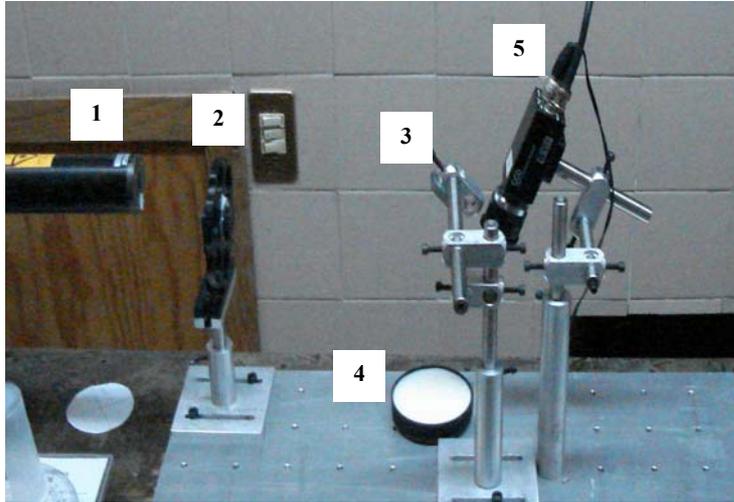


Figura 4.1 Fotografía de nuestra instalación experimental: 1) láser de He-Ne ($\lambda=632.8\text{nm}$, $P_0=35\text{mW}$), 2) porta filtro rotatorio conteniendo 5 filtros neutros, 3) espejo delgado, 4) phantom líquido, y 5) cámara CCD para la toma de las imágenes luminosas por cada filtro.

El haz de luz horizontal de un láser de He-Ne ($\lambda=632.8\text{ nm}$, $P_0= 35\text{ mW}$, $\phi=1\text{ mm}$) es desviado de su trayectoria por un espejo colocado a 45° por encima de la superficie de la muestra para garantizar una incidencia normal sobre la misma. Como sistema de detección se utilizó una cámara CCD (Sony, XC-ST70) colocada a 25 cm por encima de la superficie del tejido y ligeramente inclinada (aproximadamente 20° respecto al eje vertical) para evitar la captura de la luz especular, reflejada por el tejido. La cámara, con un arreglo de 640×480 pixeles cada uno de dimensión de $11\mu\text{m}$ de ancho por $13\mu\text{m}$ de alto, tiene un rango dinámico limitado de 0-255 niveles de gris (poco más de dos órdenes de magnitud de la intensidad) por lo que necesita ser extendido a un rango dinámico mayor (aproximadamente 5 órdenes) para garantizar la medición de los niveles de la luz reflejada difusamente en toda la zona radial de interés. Esta dificultad fue resuelta utilizando 5 filtros neutros (Edmund Optics) de diferentes densidades ópticas ($DO= 0.5, 1, 2, 3$ y 4), colocados en un porta filtro rotatorio a la salida del láser [2]. El lente usado en la cámara CCD para la captura de las imágenes fue uno tipo zoom

(Electrophysics, con $f/\#$ desde 1.4 a 16 y distancia focal de 25.0 mm) ajustando su diafragma en el número f igual a 5.6.

Se tomaron 6 imágenes en total: una por cada filtro neutral, y otra sin filtro ($DO=0$). Estas imágenes fueron inicialmente cargadas desde MathCad® [4], y posteriormente mediante el código que desarrollamos con el programa MATLAB®R2006a leímos y procesamos los datos, guardando los resultados conteniendo la distribución lateral $Rd(\text{pixel})$, en un fichero de datos que entrega el propio programa.

4.2.1 Programa desarrollado en MATLAB®R2006a para obtener $Rd(r)$

El programa se inicia leyendo la imagen tomada con el filtro neutro de $DO=4$ garantizando que ésta no esté saturada en ningún pixel. Como las imágenes tomadas tienen simetría radial, se encuentra el centro de masa o centroide convirtiendo previamente la imagen en un arreglo binario [5]. Una vez encontrado el centroide, se selecciona la fila de la matriz bidimensional que lo contiene y se halla el perfil de intensidad de la imagen a lo largo de esta fila (nivel de gris vs número del píxel del CDD), comenzando la lectura desde el valor correspondiente a la columna de la imagen que determina el centroide.

El programa continua leyendo las imágenes tomadas con cada uno de los filtros neutros utilizados ($DO= 3, 2, 1, 0.5$), así como la imagen sin filtro y se guardan en matrices bidimensionales independientes.

A continuación se lee de cada una de las matrices anteriores (a lo largo de la fila que contiene al centroide) el perfil de intensidad. De esta forma se puede determinar para cada una de las matrices el valor del píxel a partir del cual el valor de intensidad deja de estar saturado. Esto se aprecia en la figura 4.2.

Para poder construir el perfil de intensidad en todo el intervalo de los píxeles es necesario componer adecuadamente cada una de los perfiles individuales anteriores: se comienza la lectura con la imagen tomada con el filtro de densidad óptica mayor ($DO=4$) leyendo hasta el primer píxel donde el perfil

de intensidad de la imagen correspondiente al filtro DO=3 deja de ser saturada (pixel P3). Posteriormente se lee la imagen tomada con el filtro de densidad óptica DO=3 desde el pixel P3 hasta el primer pixel donde el perfil de intensidad de la imagen correspondiente al filtro DO=2 deja de ser saturada (pixel P2). Así se procede sucesivamente hasta leer la imagen sin filtro DO=0 desde el pixel P0 hasta el pixel 640.

Cada uno de estos intervalos de intensidad vs pixel se guarda en un archivo con extensión txt, y se multiplica por el correspondiente factor de atenuación inverso (10^{OD}) para obtener los valores reales de la intensidad sin el filtro atenuante. Finalmente se ensamblan los seis intervalos anteriores, resultando así el perfil de intensidad a lo largo de todos los pixeles del CCD. Finalmente se hace corresponder el espacio imagen (pixeles) con el espacio objeto de la muestra (distancia radial) a través de un factor de escala que se mide experimentalmente, como se explicará en detalle en el acápite 4.3, determinándose así el perfil de intensidad radial de la zona de interés de la muestra, $Rd(r)$.

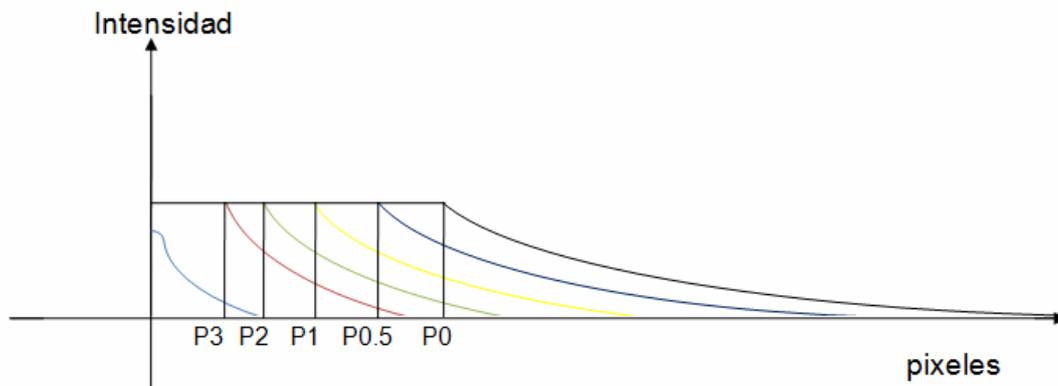


Figura 4.2 Representación esquemática del perfil de intensidad de cada matriz correspondiente a los filtros de DO variable, leídas por la fila que contiene al centroide. Los puntos P3, P2, P1, P0.5 y P0 representan los valores iniciales de los píxeles donde la imagen deja de ser saturada.

En el apéndice A se muestra el programa desarrollado, al que nombramos como *Videreflectometria.m*, con el que se puede generar la curva de

reflectancia $Rd(\text{pixel})$ a partir de las seis imágenes tomadas con los filtros neutros descritos anteriormente.

4.2.2 Medición de la reflexión difusa total Rd

Los parámetros ópticos μ_a y μ_s' de la muestra de estudio se pueden determinar si al mismo tiempo que se realiza el registro de $Rd(r)$, se mide la reflexión difusa total Rd (2-66), obtenida mediante la integración de $Rd(r)$ sobre toda la superficie del tejido tal como se explicó en el Capítulo 2.

Como se observa en esa ecuación, ésta queda expresada en términos de los coeficientes de absorción, de esparcimiento reducido y del parámetro A .

$$\text{Si se define a } Np = \frac{\mu_s'}{\mu_a} \quad (4-1)$$

se puede describir la expresión (2-66) en términos de Np y de A [6] como sigue:

$$Rd = \frac{1}{2} \exp\left(-\frac{z_0}{\delta}\right) \left(1 + \exp\left(-\frac{4AD}{\delta}\right)\right) = \frac{1}{2} \exp\left(-\sqrt{\frac{3}{1+Np}}\right) \left(1 + \exp\left(-4A\sqrt{\frac{1}{3(1+Np)}}\right)\right) \quad (4-2)$$

La reflexión difusa total se mide colocando en la instalación experimental un fotodiodo a una distancia fija de la superficie de la muestra, figura 4.3, de tal forma que permita capturar una porción de la luz total esparcida. Éste también es colocado ligeramente fuera de eje (aproximadamente 20°) para evitar el registro de la luz reflejada especularmente por la muestra.

Realizando separadamente dos mediciones, una para la muestra de estudio (M_m) y otra para un difusor estándar conocido (M_{est}), Spectralon (Ocean Optics, Labsphere) cuya reflectividad es del 99% (400-1500 nm), se calcula la reflexión difusa total Rd de la muestra como sigue [2]:

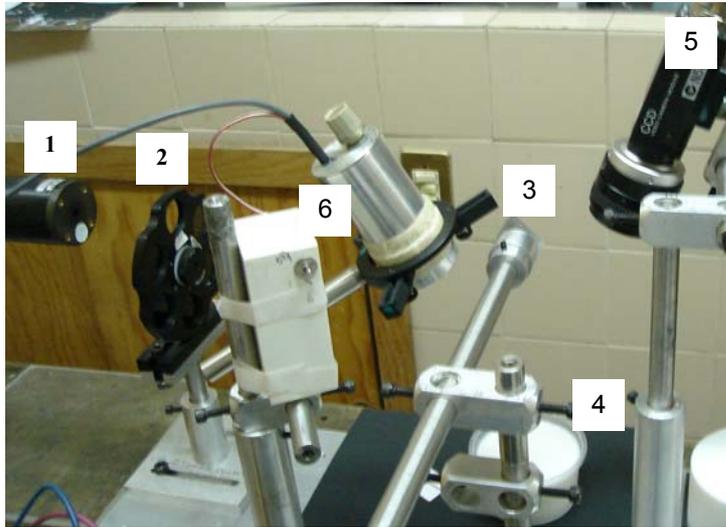


Figura 4.3 Fotografía de la instalación experimental para medir la reflexión difusa total: 1) láser de He-Ne, 2) porta filtro rotatorio colocado en la posición sin filtros neutrales, 3) espejo delgado, 4) phantom líquido, 5) cámara CCD, y 6) fotodiodo como detector para capturar una porción de la luz difusa total.

$$\frac{M_m}{M_{est}} = \frac{SD\eta_m Rd}{SD\eta_{est} Rd_{est}} \quad (4-3)$$

donde S es la fuente de luz, D es la respuesta del detector, η_m y η_{est} es la eficiencia de colección del detector de la luz difusa reflejada por la muestra y por el estándar, respectivamente. Como la fuente de luz y la respuesta del detector para ambas mediciones es la misma, S y D se cancelan en la ecuación (4-3). La eficiencia de colección del fotodiodo sólo depende de la geometría de la instalación experimental por lo que ambas mediciones se asumen iguales. Resolviendo la ecuación (4-3), la reflexión difusa total de la muestra se calcula como:

$$Rd = \frac{M_m}{M_{est}} Rd_{est} \quad (4-4)$$

Con el valor medido para Rd, Np se puede determinar mediante la ecuación (4-2), es decir encontrando el valor de Np para el cual la diferencia entre la reflexión difusa total medida experimentalmente y la calculada teóricamente es cero. Sustituyendo el valor de Np hallado en la expresión analítica para la

distribución lateral de la luz difusa $Rd(r)$, ecuación (2-62), se encuentra una expresión únicamente en términos de μ_s' o de μ_a . Mediante un proceso de ajuste no lineal por mínimos cuadrados de la curva de reflectancia obtenida experimentalmente con el modelo analítico, se determina a los coeficientes μ_s' o μ_a .

4.2.3 Programa desarrollado en MATLAB®R2006a para calcular Np

Mediante un código elaborado en MATLAB®R2006a, denominado *fzero_f2EXP.m*, que permite encontrar el cero de una función con el código *fzero*, declaramos primero una función *f* definida como: `function f=f2EXP(Np)` que evalúa la expresión (4-2), siempre que el índice de refracción relativo entre las fronteras del medio en estudio sea conocido. Esta función permite además realizar la diferencia entre la reflexión difusa total analítica y la calculada experimentalmente (RdT y RdE , respectivamente en ambiente MATLAB) cuando este último sea un dato de entrada.

Con el programa *fzero_f2EXP.m*, graficamos la función $f=RdT-RdE$ Vs Np , con el fin de visualizar el intervalo donde pueda encontrarse un cero para un RdE fijo. Escogiendo dos valores extremos para Np ($Np1$ y $Np2$) que cumpla esta condición, se procede a introducirlos en el argumento de la función *fzero*, declarada como: `raiz=fzero('f2EXP', [Np1 Np2])` la cual entrega el valor de la raíz de la función.

Según Jacques [7], la reflexión difusa total de un medio homogéneo, semi-infinito y con coeficientes de absorción y de esparcimiento reducido conocidos, se puede aproximar a la siguiente expresión analítica:

$$Rd \approx \exp(-A_1 \delta \mu_a) = \exp\left(-\frac{A_1}{\sqrt{3(1+Np)}}\right) \quad (4-5)$$

donde δ es la profundidad de penetración óptica, expresada por la ecuación (2-64), y $A_1 \delta$ es el camino efectivo (L) que el fotón recorre en el tejido.

El valor de A_1 en esta expresión no es constante, depende de Np y del índice

de refracción relativo n_{rel} (2-58) y tiene un valor aproximado entre 7 y 8 para la mayoría de los tejidos blandos. Seleccionando A_1 como constante en la ecuación (4-5) se puede obtener un comportamiento aproximado de R_d en función de N_p . Para un cálculo más preciso de R_d , deberá especificarse el valor de A_1 como una función de N_p ; el autor especifica este comportamiento para $n_{rel}=1.33$. Con el valor medido de la reflexión difusa total de la muestra se puede calcular N_p en función de A_1 . Mediante un programa en MATLAB® el autor ilustra un lazo iterativo que permite encontrar el valor de N_p , A_1 y el número de iteraciones realizadas.

Nosotros desarrollamos un código auxiliar denominado *RdT_Np.m*, que grafica tanto a la reflectancia difusa total R_d expresada con la formulación de Farrell et al. (4-2), como a R_d expresada con la formulación de Jacques (4-5) para un medio acuoso cuyo n_{rel} es de 1.33 y constante A_1 igual a 7.6. Esto se ilustra en la figura 4.4.

Como se puede observar, ambos gráficos tienen un comportamiento semejante para valores de la reflectancia difusa total entre $0.4 < R_d < 0.8$. Realizando una tabla comparativa de los valores de N_p encontrados mediante cada expresión analítica se obtiene el error relativo para esta magnitud (ver Tabla 4.1).

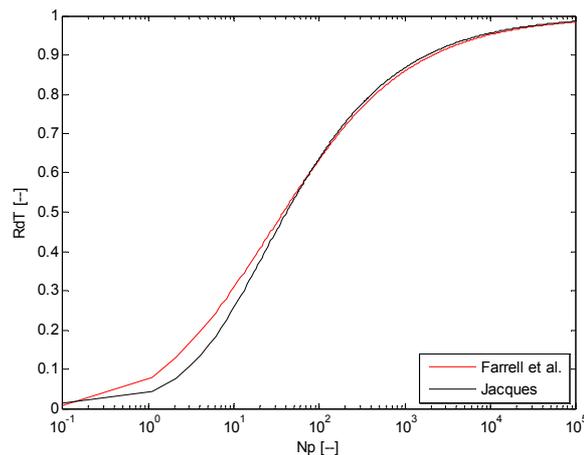


Figura 4.4 Comparación de la reflexión difusa total (RdT) para un medio acuoso con $n_{rel}=1.33$, entre la expresión analítica de Farrell et al. y la de Jacques, en función de N_p .

TABLA 4.1 Error relativo porcentual de N_p (con respecto a la formulación de Farrell *et al.*), calculado con la expresión analítica de Jacques y la de Farrell *et al.* para distintos valores simulados de la reflexión difusa total experimental (RdE), para un medio acuoso con $n_{rel}=1.33$.

RdTE	N_p <i>Jacques</i>	N_p <i>Farrell</i>	Error relativo %
0.1	1.91	1.46	30.82
0.2	5.21	4.19	24.34
0.3	10.52	9.40	11.91
0.4	19.67	19.16	2.66
0.5	36.81	37.81	2.64
0.6	72.80	76.29	4.57
0.7	163.44	167.94	2.68
0.8	481.09	453.77	6.02
0.9	2965.12	2129.78	39.22

Se puede por tanto deducir el valor de N_p mediante la formulación más simple dada por Jacques pero solamente para un medio acuoso con índice de refracción relativo igual a 1.33, a menos que se deduzca el valor de A_1 para medios diferentes, pero este método no se describe en su artículo. Nosotros usaremos la formulación de Farrell *et al.* porque es más general ya que encuentra la relación N_p para cualquier medio biológico que se pretenda estudiar.

En el apéndice B se incluyen todos los programas mencionados en este acápite, con sus correspondientes comentarios, para hallar N_p .

4.3 AJUSTE NO LINEAL DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Para determinar el coeficiente de interacción total μ_t' (2-45) y el coeficiente de atenuación efectivo μ_{eff} (2-47) usamos un algoritmo iterativo de optimización que resuelve problemas de ajuste por mínimos cuadrados no lineales, específicamente el método de Levenberg-Marquardt [8-9] implementado en el Toolbox del software MATLAB®R2006a. Los parámetros ópticos μ_t' , y μ_{eff} pueden hallarse por tanto a través de un ajuste por mínimos cuadrados no lineales a partir de la curva de reflectancia obtenida experimentalmente con la función analítica de Farrell *et al.* para esta magnitud.

Lo primero es escribir la expresión analítica $Rd(r)$ (2-62) explícitamente en

función de la distancia radial r y de los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} . Calculando el valor de A para $n=1.35$ (índice de refracción del phantom líquido descrito en el Capítulo 3 y determinado por la ecuación 3-4), hallamos que es igual a 2.9190 y sustituyéndolo en la expresión analítica, ésta estará escrita adecuadamente para que realicemos el ajuste de la curva de reflectancia obtenida experimentalmente salvo un factor de escala K , al que nos referiremos posteriormente.

La ecuación así escrita resulta tener la siguiente expresión:

$$Rd(r) = \frac{K}{4\pi} \left[\frac{1}{\mu_t'} \left(\mu_{\text{eff}} + \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{1}{\mu_t'}\right)^2 + r^2}} \right) e^{-\mu_{\text{eff}} \sqrt{\left(\frac{1}{\mu_t'}\right)^2 + r^2}} \frac{1}{\left(\frac{1}{\mu_t'}\right)^2 + r^2} + \left(\frac{1}{\mu_t'} + \frac{4 \cdot 2.9190}{3 \mu_t'} \right) \left(\mu_{\text{eff}} + \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{1}{\mu_t'} + \frac{4 \cdot 2.9190}{3 \mu_t'}\right)^2 + r^2}} \right) e^{-\mu_{\text{eff}} \sqrt{\left(\frac{1}{\mu_t'} + \frac{4 \cdot 2.9190}{3 \mu_t'}\right)^2 + r^2}} \frac{1}{\left(\frac{1}{\mu_t'} + \frac{4 \cdot 2.9190}{3 \mu_t'}\right)^2 + r^2} \right] \quad (4-6)$$

Esta expresión la escribimos en código MATLAB, al que nombramos *KRd_ab.m*, donde sustituimos μ_t' por a , y μ_{eff} por b .

Ambas curvas de reflectancia, la experimental $Rd(r)_{\text{Exp}}$, y la analítica $Rd(r)_{\text{Teo}}$ no se encuentran en la misma escala de modo que es necesario calibrar los datos experimentales para que coexistan en la misma escala de los valores analíticos. Esto se garantiza mediante la siguiente expresión:

$$Rd(r)_{\text{Exp}} = K * Rd(r)_{\text{Teo}} \quad (4-7)$$

donde el factor de proporcionalidad K es el factor de escala o instrumental que contiene la información de la geometría y de todas las partes que conforman al arreglo experimental. Éste se puede determinar mediante un procedimiento de ajuste lineal de mínimos cuadrados [1] utilizando como referencia un phantom con propiedades ópticas conocidas.

Por otra parte, la curva de reflectancia construida con el programa de *Videoreflectometria.m*, se obtiene en función de los pixeles de la CCD por lo que es necesario pasar de estas unidades a las de centímetros correspondiente a la distancia radial r medida desde el punto de incidencia del láser hasta el punto de detección. Este cambio de escala se realizó tomando una moneda de 1 peso (o de 2 pesos) y medimos su diámetro con un pié de rey digital (Vernier), luego la colocamos sobre una superficie oscura a la misma altura con que se registran las imágenes con los phantoms, y se capturó la imagen de la moneda con la cámara CCD. Posteriormente con la ayuda del programa Corel PHOTO-PAINT 11, cargamos esa imagen y medimos su diámetro en pixeles. Aplicando la regla de tres, se determina primero la cantidad de cm equivalentes a 640 pixeles, y con esta medida se calcula cuántos cm equivalen a un pixel. Cada vez que fue necesario mover los elementos que conforman al arreglo experimental se determinó esta medida y se obtuvieron valores de 0.0077 cm, 0.0078 cm y 0.0079 cm para cada caso.

Escribiendo un código en el ambiente MATLAB que entrega un fichero con dos columnas de datos: $R_d(\text{pixel})$ Vs pixel, y luego con otro código para convertir los pixeles en cm, se obtiene un fichero .txt con los datos experimentales de $R_d(r)$ Vs r .

Con el código que elaboramos nombrado *Encuentra_K.m*, se carga tanto al fichero que contiene a los datos de la curva de reflectancia teórica (con los parámetros ópticos “verdaderos” del phantom) como al fichero que contiene a los datos experimentales. A continuación mediante un código propio del MATLAB [$p = \text{polyfit}(x, y, 1)$] que realiza el ajuste lineal por mínimos cuadrados de un polinomio de grado uno, se encuentra la pendiente que ajusta $R_d(r)_{\text{Exp}}$ Vs $R_d(r)_{\text{Teo}}$, siendo ésta precisamente el factor de escala K . Con este valor hallado, se sustituye en la expresión (4-6), de modo que así queda escalada la función analítica a los datos experimentales y podemos realizar el ajuste por mínimos cuadrados no lineales para determinar los parámetros ópticos.

Con un código auxiliar muy sencillo [*Ventana_ajuste.m*] para cargar el fichero .txt que contiene a los datos experimentales, y escribiendo el comando *cftool*, se abre la ventana de ajuste de curvas no lineales implementado en MATLAB®R2006a (Curve Fitting Tool).

Esta ventana brinda distintas opciones de ajuste siendo la más recomendada el llamado Bisquare, el cual realiza el ajuste minimizando la suma del cuadrado de los residuos a través del algoritmo de Levenberg-Marquardt. La ventana de ajuste también da la posibilidad de cambiar los criterios de convergencia tales como: el número máximo permitido para evaluar a la función modelo (MaxFunEvals), el número máximo de iteraciones a realizar (MaxIter), la tolerancia permitida sobre el valor de los coeficientes (TolX) y la tolerancia permitida sobre el valor de la función modelo (TolFun).

Como es conocido, para ajustar un modelo no lineal a los datos experimentales los coeficientes son estimados mediante aproximaciones iterativas que requieren comenzar con un estimado inicial para cada uno de ellos. Definiendo a la función de mérito como la suma del cuadrado de la diferencia entre los datos medidos y la función modelo [9] (la diferencia se le conoce como residuo):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4-8)$$

se determinan los parámetros que son mejor ajustados a la función modelo siempre y cuando se minimice la función de mérito.

4.3.1 Algoritmos para la recuperación de las propiedades ópticas en tejidos sintéticos con curvas de reflectancia de pruebas

Con el propósito de evaluar la precisión de recuperación de los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} del tejido sintético con los algoritmos de ajuste descritos anteriormente, hemos generado una serie de curvas de reflectancia de pruebas utilizando el modelo analítico de Farrell *et al.* y simulando a los errores aleatorios de las mediciones realizadas y a las propiedades ópticas

de los modelos de tejidos sintéticos líquidos descritos en el Capítulo 3. En primer lugar realizamos la simulación usando la configuración de nuestra instalación experimental considerando un índice de refracción relativo (frontera aire-tejido) igual a 1.35. Las simulaciones fueron realizadas para dos valores del coeficiente de esparcimiento $\mu_s = 64.21 \text{ cm}^{-1}$ y 128.43 cm^{-1} , y con un coeficiente de absorción μ_a constante e igual a 0.00292 cm^{-1} . A la curva teórica simulada con estos datos, le añadimos un ruido aleatorio en ambos sentidos de la curva (positivo y negativo) de tal forma que se correspondan con los errores aleatorios de nuestras mediciones experimentales.

El primer conjunto de datos sintéticos (o simulados) fue concebido para la recuperación de los parámetros ópticos $\mu_t' = 17.15 \text{ cm}^{-1}$ y $\mu_{\text{eff}} = 0.39 \text{ cm}^{-1}$, mientras que el segundo conjunto fue para $\mu_t' = 34.31 \text{ cm}^{-1}$ y $\mu_{\text{eff}} = 0.55 \text{ cm}^{-1}$. Estas curvas fueron generadas para dos errores aleatorios experimentales: 0.03 y 0.05, y ajustadas para valores de $r > 1 \text{ mfp}'$.

Mediante el código desarrollado *Genera_DatosSinteticos.m* (ver apéndice C) se reprodujeron las curvas de prueba simulando a la reflectancia difusa radial experimental (Rds en ambiente MATLAB) a través de la siguiente expresión:

$$Rds = RdT \pm N \quad (4-9)$$

donde RdT es la reflectancia difusa radial teórica, el signo \pm reproduce la aleatoriedad de los datos en ambos sentidos de la curva y el criterio para elegir el ruido N está basado en valores reales de los errores aleatorios de las mediciones realizadas. Éste lo expresamos en el ambiente MATLAB como sigue:

$$N = Ngain * RdT \quad (4-10)$$

donde Ngain representa al error aleatorio de los datos experimentales.

Por medio del código nombrado como *RdFarrell_ab.m* escribimos la función modelo (4-6) en los términos descritos en el acápite anterior pero con $K=1$, y con el código auxiliar *Ventana_ajuste.m*, abrimos la ventana de ajuste de curvas no lineales para proceder a la recuperación de los parámetros ópticos

del tejido sintético líquido.

La precisión con que se recuperan los parámetros ópticos del phantom se midió a través del error relativo porcentual resultando, para todos los casos simulados, igual al cero por ciento, como se verá en el Capítulo 5 de esta tesis. Este resultado indica que el procedimiento del ajuste no lineal durante la calibración del arreglo experimental, es el adecuado.

4.4 INSTALACIÓN EXPERIMENTAL PROPUESTA PARA VERIFICAR LINEALIDAD DE LA CCD

Durante el proceso de captura de las imágenes con la técnica de Video Reflectometría la cámara CCD usada debe presentar una respuesta lineal entre el nivel de gris (escala 0-255) de las imágenes adquiridas y el flujo luminoso de entrada proveniente de la muestra en estudio. La no linealidad impondría estudiar esta dependencia para encontrar una curva de calibración y aplicarla en el proceso de obtención del perfil de reflexión difusa radial de las muestras [2].

En general una cámara CCD (Charge Coupled Devices) es un dispositivo electrónico de silicio conformado por un gran número de elementos fotosensibles (píxeles) ordenados en forma de arreglo, cuya propiedad es generar electrones dependiendo de la cantidad de luz que incide sobre ellos. Estos dispositivos se consideran idealmente lineales si su respuesta es proporcional al flujo incidente desde el nivel más bajo de luz detectable (determinado por las diversas fuentes de ruido) hasta el máximo nivel de intensidad admisible por el dispositivo (determinado por el nivel de saturación igual a 255) [10].

Con el objetivo de verificar la linealidad de la cámara CCD usada en nuestras mediciones, se propuso una instalación experimental de tal manera que para variaciones proporcionales conocidas de un flujo de luz incidente se pudiera medir la respuesta del CCD en términos del nivel de gris promedio de la imagen producida por dicho flujo incidente. Garantizando previamente que el

histograma de la imagen capturada con el mayor flujo estuviera muy próximo a 255 se evitó la saturación de los píxeles que conforman la imagen asociada al haz. Esta instalación se describe a través de la figura 4.5.

La fuente extendida de la luz roja procedente de un LED modificado (se esmeriló la superficie convexa de salida hasta convertirla en plana y difusa) se colocó en el foco de una lente plano-convexa con distancia focal aproximadamente igual a 3 cm de modo que el haz de luz “casi paralelo” incidiera directamente sobre la cámara. Con la finalidad de evitar la saturación de los píxeles de la CCD y capturar una imagen lo más homogénea posible en cuanto a niveles de intensidad se colocó justo delante de ella una lámina difusora de vidrio (1 mm de espesor). Las variaciones del flujo de luz de referencia se realizaron mediante un filtro neutro de densidad óptica variable (Edmund Optics). Colocando un cubo divisor de haz entre éste y la cámara, la porción de la luz desviada a 45° se hizo incidir sobre el cabezal de detección de un Radiómetro Digital (Newport) para medir las variaciones proporcionales del flujo luminoso.

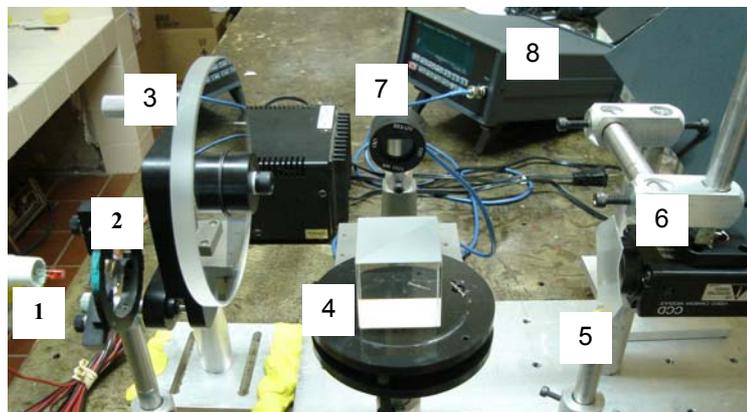


Figura 4.5 Fotografía de la instalación experimental para verificar la linealidad de la CCD: 1) LED rojo, 2) lente plano-convexa, 3) filtro neutro de densidad óptica variable, 4) cubo divisor de haz a 45°, 5) lámina de difusora de vidrio, 6) cámara CCD, 7) cabezal de detección y 8) Radiómetro Digital.

Con un código desarrollado específicamente para este estudio (ambiente MATLAB®R2006a) se logró calcular el nivel de gris promedio para cada una

de las imágenes registradas y con otro auxiliar se graficó el flujo de referencia en función de los niveles de gris mencionados, observándose que la respuesta de la CCD es lineal para un conjunto total de cinco mediciones realizadas. En el apéndice D se muestran los resultados obtenidos y el ajuste lineal de los datos experimentales. Añadimos además una muestra de las imágenes capturadas.

4.5 CONCLUSIONES

Se describió la instalación experimental de Video Reflectometría implementada en nuestro laboratorio para determinar las propiedades ópticas de tejidos sintéticos líquidos preparados por nosotros y usados para calibrar nuestro arreglo experimental.

Se desarrollaron dos códigos fundamentales: *Videoreflectometria.m* y *fzero_f2EXP.m*, en el lenguaje de programación MATLAB®R2006a, que permiten construir la curva de reflectancia $Rd(r)$ y encontrar el cociente Np respectivamente ($Np = \frac{\mu_s'}{\mu_a}$).

El procedimiento del ajuste no lineal por mínimos cuadrados de la curva de reflectancia obtenida experimentalmente, con el modelo analítico de Farrell *et al.*, es el adecuado para recuperar los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} del tejido en estudio. Esta afirmación fue confirmada con las curvas de reflectancia de pruebas generada con datos simulados a través del código *Genera_DatosSinteticos.m*.

Se demostró que la cámara CCD utilizada presenta un grado de linealidad apropiado para la aplicación de Video Reflectometría que aquí se discute. Finalmente es importante destacar que para calibrar la instalación experimental de Video Reflectometría es necesario conocer las propiedades ópticas μ_a y μ_s' con que fueron preparados los tejidos sintéticos.

REFERENCIAS

- [1] T. J. Farrell, M. S. Patterson and B. Wilson, "A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties *in vivo*," *Med. Phys.* **19**, 879-888 (1992).
- [2] S. Jacques, A. Gutsche, J. Schwartz, L. Wang, and F. Tittel, "Video reflectometry to specify optical properties of tissue *in vivo*," in *Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring*, edited by G. Mueller, Proceedings of SPIE 1S11, 211-226 (1993).
- [3] M. Cunill, J. Castro, S. Vázquez, J. A. Delgado, "Implementing and Characterizing a Video Reflectometry Set-up", In *RIAO/OPTILAS 2007: 6th Ibero-American Conference on Optics (RIAO); 9th Latin-American Meeting on Optics, Lasers and Applications (OPTILAS)*; DOI:10.1063/1.2926941; AIP Conf. Proc. 992; April 15, 2008, pp.632-637.
- [4] Margarita Cunill Rodríguez, Jorge Castro Ramos, José Alberto Delgado Atencio, Sergio Vázquez Montiel, and Miguel Alcaraz Rivera. "Experimental Determination of Local Diffuse Reflectance in Highly Scattering Media", In *Ninth Mexican Symposium on Medical Physics*, edited by Hilda Mercado Uribe et al., AIP Conference Proceedings 854, Melville, New York, 2006, pp 145-147.
- [5] Rafael C. González, Richard E. Woods, Steven L. Eddins, "Morphological Image Processing", in *Digital Image Processing Using MATLAB®*, eds (SPIE Press, 2002), pp 348-391.
- [6] Beop-Min Kim, "Optical Property Measurements of Turbid Media Using Continuous-Wave Light Sources," *Journal of the Korean Physical Society* **44**, 427-434 (2004).
- [7] S. L. Jacques, "Diffuse reflectance from a semiinfinite medium," (1999), <http://omlc.ogi.edu/news/may99/rd/index.html>
- [8] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, B. P. Flannery, "Modeling of Data", in *Numerical Recipes in C*, eds (Cambridge University Press, 1992),

pp 656-706.

[9] M. I. A. Lourakis, "A Brief Description of the Levenberg-Marquardt Algorithm Implemened by levmar", (2005), <http://www.ics.forth.gr/~lourakis/levmar/levmar.pdf>

[10] C. E. Fontalvo, D. Peña y R. Sarmiento, "Caracterización de una cámara CCD para su uso como detector espectroscópico", Revista Colombiana de Física **38**, 245-248 (2006).

Capítulo 5

Resultados experimentales

En este capítulo se consideran los resultados obtenidos tanto para la recuperación de los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} , como para la recuperación de $Np = \frac{\mu_s'}{\mu_a}$ en muestras de tejidos sintéticos líquidos y mediante la técnica

de Video Reflectometría implementada en nuestro laboratorio.

Consideraremos oportuno presentar inicialmente los parámetros ópticos de los tejidos sintéticos preparados por nosotros con sus correspondientes curvas de reflectancia, presentando también estas curvas para muestras de leche comercial (Alpura Light 2000) y para un volumen cilíndrico de Teflón. Estas dos últimas con el propósito de caracterizar la instalación experimental en cuanto a la repetibilidad de las mediciones realizadas.

Seguidamente se presenta la recuperación de los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} mediante las curvas de reflectancia de pruebas descritas en el acápite 4.3.1.

Por último se muestran los resultados obtenidos experimentalmente para la recuperación de las propiedades ópticas planteadas al inicio de esta introducción, siendo éste uno de los objetivos específicos propuestos en el proyecto de tesis.

5.1 PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS TEJIDOS SINTÉTICOS USADOS

Como se explicó en el Capítulo 3, los modelos de tejidos sintéticos líquidos usados para la calibración de la instalación experimental fueron cuatro phantoms de 112 ml conteniendo diferentes proporciones de Lipofundin-10% (o de IVELIP-10%) como medio simulador de las propiedades de esparcimiento de la piel. Éstas fueron preparadas en contenedores plásticos de 7 cm de diámetro por 4 cm de alto, definiendo dimensiones finitas para las muestras, las cuales son mayores que 40 veces el mfp' (camino libre medio de transporte) lo que garantiza que el efecto de borde debido a la frontera sea despreciable [1].

Por otra parte, si se quiere obtener un phantom con $\mu_s' = 25 \text{ cm}^{-1}$ (coeficiente de esparcimiento reducido de la dermis, acápite 3.3.2) a través de la ecuación 3-24 se puede determinar aproximadamente la cantidad de ml necesarios de Intralípido (Vint), encontrándose que es de 22 ml. Consideramos calcular el coeficiente de esparcimiento (o de esparcimiento reducido) del phantom para 4 volúmenes prefijados cercanos a este valor. Los parámetros ópticos hallados para estos modelos de tejidos se muestran en la tabla 5.1.

TABLA 5.1 Parámetros ópticos del phantom, para un volumen total de 112 ml conteniendo 15, 20, 25 o 30 ml de Lipofundin-10% (o del Ivelip-10%), calculados en $\lambda=633 \text{ nm}$. Se consideró al coeficiente de absorción constante para todas las muestras e igual al del H_2O (0.00292 cm^{-1}) así como también al índice de refracción aproximadamente igual a 1.35. Para todas las muestras el factor de anisotropía del medio, g , es igual a 0.7329.

Vint [ml]	μ_s [cm^{-1}]	μ_s' [cm^{-1}]	μ_t' [cm^{-1}]	μ_{eff} [cm^{-1}]	mfp' [cm]
15	64.21	17.15	17.15	0.39	0.058
20	85.62	22.87	22.87	0.45	0.044
25	107.02	28.59	28.59	0.50	0.035
30	128.43	34.31	34.31	0.55	0.029

El Lipofundin-10% (BRAUN) y el Ivelip-10% (BAXTER), son nutrientes similares, en cuanto a su composición, con el Intralípido™ (Kabivitrum, Stockholm) (ver acápite 3.1.2) como se muestra en la tabla 5.2.

TABLA 5.2 Tabla comparativa entre los componentes de los Intralípidos usados con relación al Intralípido™ (Kabivitrum, Stockholm).

Nutrientes	Aceite de soya [g/100 ml]	Glicerina [g/100 ml]	Lecitina de huevo [g/100 ml]
Lipofundin-10%	50	12.5	4
Ivelip-10%	50	12.5	6
Intralípido™	50	11.25	6

En tanto las muestras de tejidos sintéticos sólidos elaboradas a base de agar (1g/100 ml de agua destilada) tal como se explicó en el acápite 3.4.2, tienen propiedades ópticas similares a las presentadas en la tabla 1.1. En la figura 5.1 (a, b, d y e), se muestra una vista superior para cada uno de estos tejidos y a modo solo ilustrativo, en el inciso c, se muestra la matrix de agar (sin añadirle ningún elemento esparcidor).

También con el objetivo de caracterizar la repetibilidad de adquisición de la curva de reflectancia y evaluar los errores aleatorios de las mediciones realizadas, se incluyó la leche comercial Alpura Light 2000 y un volumen cilíndrico de Teflón (8 cm de diámetro y 5 cm de alto) previamente pulida una de sus caras en el laboratorio de pruebas ópticas del INAOE (figura 5.1 f).

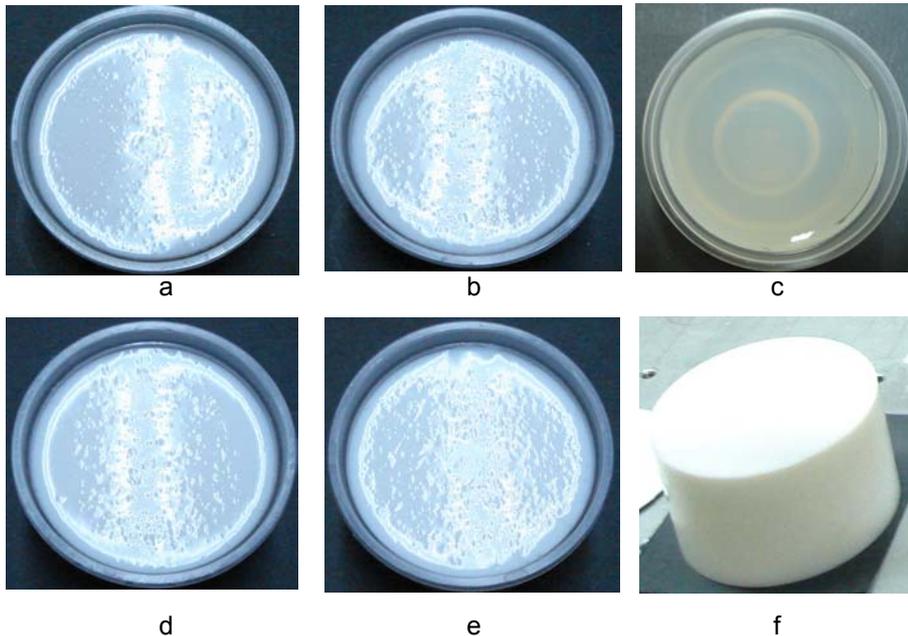


Figura 5.1 Fotografía de los phantoms sólidos usados durante la caracterización de la instalación experimental de Video Reflectometría: (a, b, d, e) a base de agar con 15, 20, 25 y 30 ml de IVELIP-10%, respectivamente, c) muestra del gel de agar (1g/100 ml) y f) volumen cilíndrico de Teflón.

5.1.2 Curvas de reflectancia de las muestras de tejidos sintéticos líquidos y sólidos a base de agar

Antes de presentar las curvas de reflectancia construidas con el programa de *Videoreflectometria.m* (Capítulo 4) comencemos mostrando una de las imágenes tomada con la CCD, por ejemplo con el filtro de DO menor (0.5) en un modelo de tejido sintético líquido con $\mu_s' = 34.31 \text{ cm}^{-1}$ (figura 5.2 a y b).

Con el código mencionado anteriormente, el programa se inicia leyendo la imagen capturada con el filtro de densidad óptica mayor y cada región o tramo de la curva de reflectancia es construido como se ilustra en la figura 5.3 y como se explicó en el acápite 4.2.1. Las imágenes presentadas en esta figura están aumentadas con relación a su original de modo que pueda ilustrarse esquemáticamente el proceso de ensamble de los seis perfiles de intensidad, para obtener finalmente el perfil de intensidad a lo largo de todos los pixeles del CCD como se muestra en la figura 5.4.

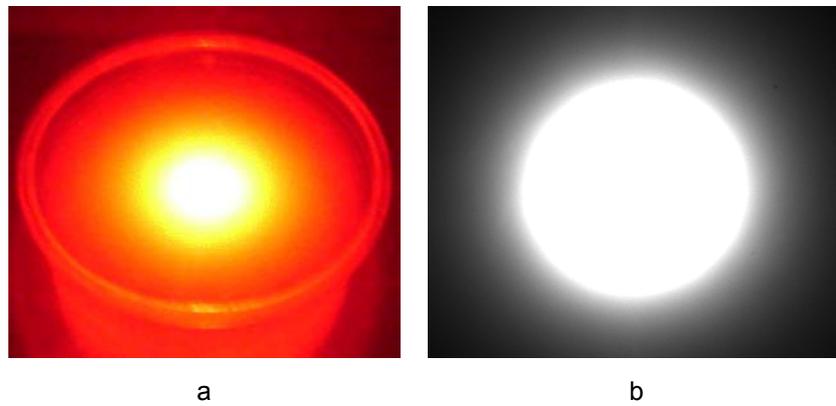


Figura 5.2 Imágenes tomadas durante el proceso de medición con la instalación de Video Reflectometría de incidencia normal (láser He-Ne, $\lambda=633$ nm): a) phantom líquido con $\mu_s'=34.31$ cm⁻¹ b) imagen capturada con la CCD con el filtro neutro de DO=0.5.

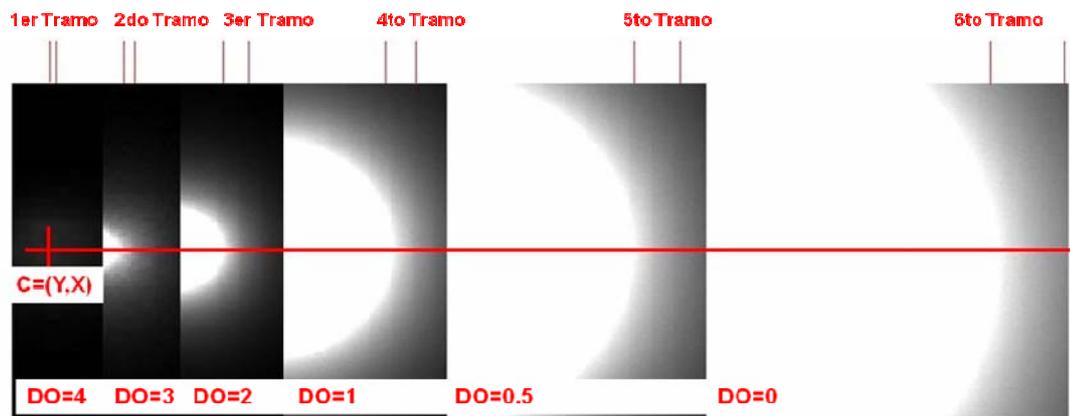


Figura 5.3 Representación esquemática para determinar los tramos de la curva de reflectancia con las seis imágenes capturadas durante el proceso de medición con la instalación experimental comenzando la lectura a partir del centroide (C) calculado para la imagen con el filtro neutro de DO=4.

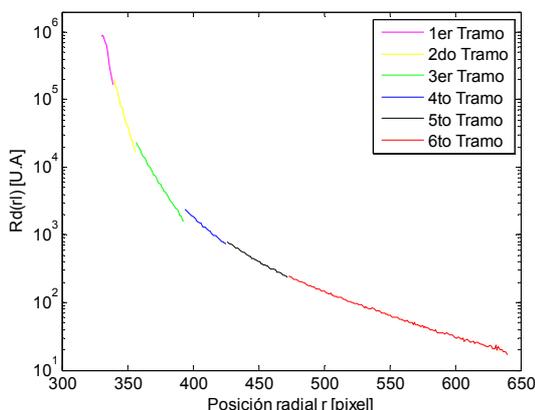


Figura 5.4 Curva de reflectancia obtenida como resultado del empalme de los 6 tramos o regiones de la curva habiendo multiplicado cada valor de $Rd(\text{pixel})$ por su factor de atenuación inverso (10^{0D}).

En la figura 5.5 a se muestra el resultado de graficar los datos de $Rd(r)$ Vs r en las muestras de tejido sintéticos líquidos con los cuatro valores del coeficiente de esparcimiento reducido (tabla 1.1). Como se puede observar, la dependencia experimental de $Rd(r)$ con este coeficiente está de acuerdo con los resultados teóricos esperados (figura 5.5 b). En tanto el resultado de graficar la reflectancia difusa radial en los tejidos sólidos a base de agar se presenta en la figura 5.6, como podemos ver, éstas tienen perfiles de intensidad similares a las anteriores, lo cual es una evidencia del bajo coeficiente de esparcimiento reducido del agar utilizado en la preparación de nuestros phantoms.

En las figuras anteriores se muestra el llamado “punto pivote” [3-4] al variar μ_s' , manteniendo constante μ_a , y este punto se alcanza alrededor de 0.16 cm de la posición radial para los phantoms líquidos, 0.18 cm para los sólidos y 0.19 cm para las curvas teóricas representadas. Como se observa $Rd(r_{\text{pivote}})$ es independiente de los coeficientes de absorción y de esparcimiento reducido.

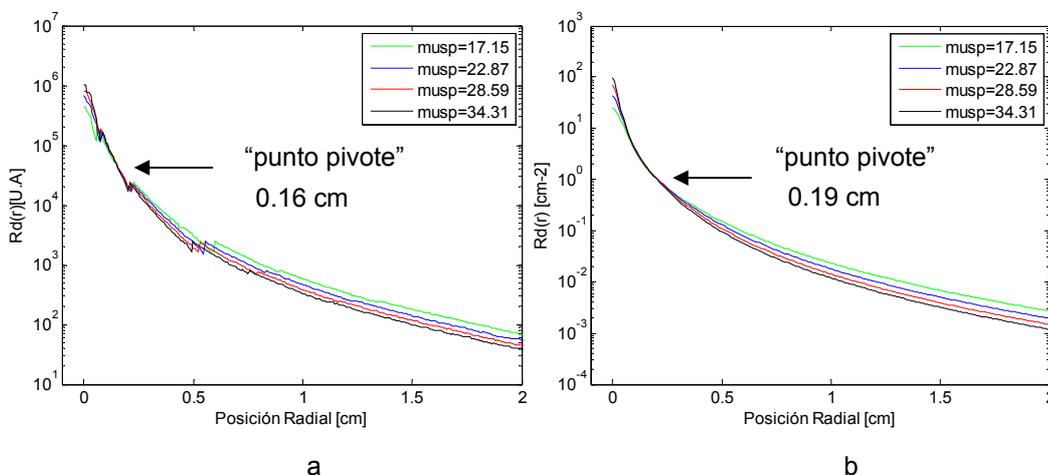


Figura 5.5 Reflectancia difusa radial $R_d(r)$ en phantoms líquidos, manteniendo constante el coeficiente de absorción y variando el coeficiente de esparsimiento reducido: a) curvas experimentales, b) curvas teóricas.

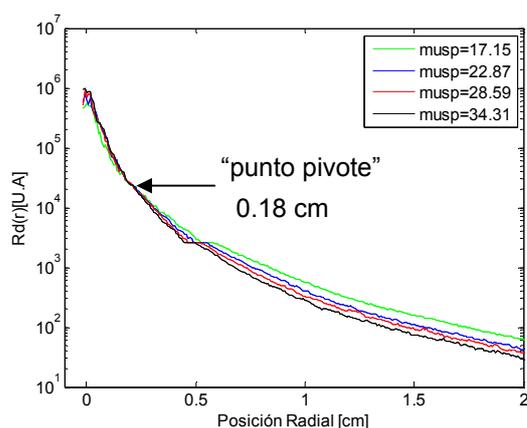


Figura 5.6 Reflectancia difusa radial $R_d(r)$ en phantoms sólidos a base de agar, manteniendo constante el coeficiente de absorción y variando el coeficiente de esparsimiento reducido.

5.2 ESTUDIO DE LA REPETIBILIDAD DE LA CURVA DE REFLECTANCIA

El estudio de la repetibilidad de adquisición de la curva de reflectancia durante el proceso de medición con la instalación experimental fue realizado midiendo cinco veces la distribución de la luz esparsida en tres muestras de tejidos sintéticos líquidos de 112 ml: dos de leche comercial Alpura Light 2000 y una conteniendo 30 ml de Lipofundin-10% ($\mu_s' = 34.31 \text{ cm}^{-1}$); y en el sólido de Teflón.

Para las dos muestras de leche, la curva promedio de reflectancia y la desviación estándar de las mediciones se muestra en la figura 5.7 (a-b) encontrando que el máximo error relativo está por debajo de un 7% y de un 6%, respectivamente, mientras que para el tejido sintético líquido con $\mu_s' = 34.31 \text{ cm}^{-1}$, se obtuvo un máximo error relativo por debajo de un 24% (figura 5.7 c). En cambio los resultados para el volumen de Teflón muestran (figura 5.7 d) que la curva de reflectancia no varía casi continuamente como en las anteriores, presumimos que esto se deba a la alta granularidad e irregularidad en su superficie con relación a las muestras de tejidos líquidos. Esta razón en combinación con pequeñas variaciones del punto de incidencia del haz láser sobre su superficie, explican los valores altos de las desviaciones estándar observadas con relación a los phantoms líquidos, hallando que el máximo error relativo está por debajo de un 46%.

Una forma de evaluar aproximadamente los errores aleatorios (E) de las mediciones realizadas fue a través del cociente de la desviación estándar (Sd) por el valor promedio de la reflectancia difusa radial $Rd(r)$ en cada punto de las curvas anteriores, esto es:

$$E = \frac{Sd}{Rd(r)} \quad (5-1)$$

En la figura 5.8 se representan los errores aleatorios de las mediciones experimentales pero sólo para las muestras de tejidos sintéticos líquidos, encontrando que su valor promedio es de 0.04, 0.02 y 0.03, respectivamente.

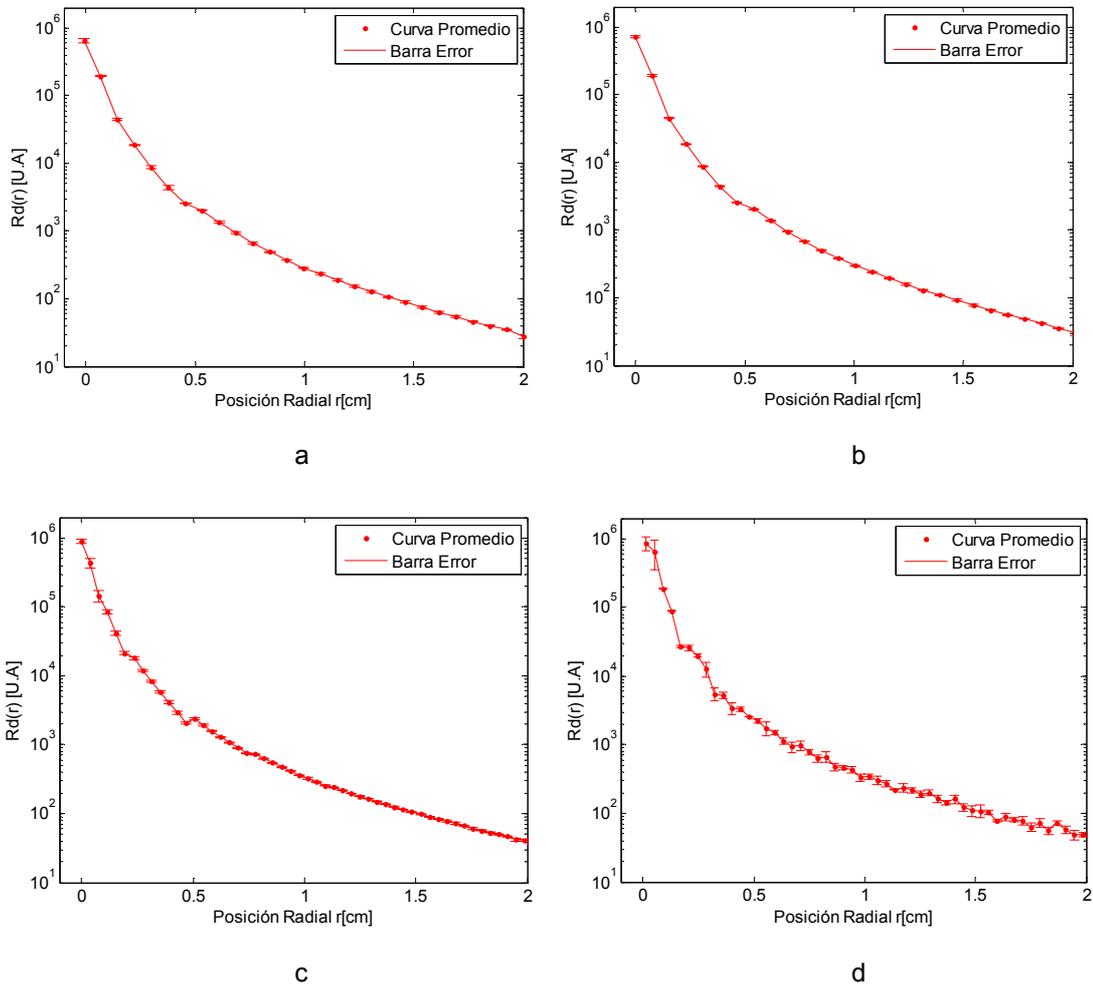


Figura 5.7 Curvas de reflectancia promedio y desviación estándar para caracterizar la instalación experimental en cuanto a la repetibilidad de las mediciones: a) y b) muestras de leche (Alpura Light 2000), c) phantom líquido conteniendo 30 ml de Lipofundin-10% y d) volumen cilíndrico de Teflón.

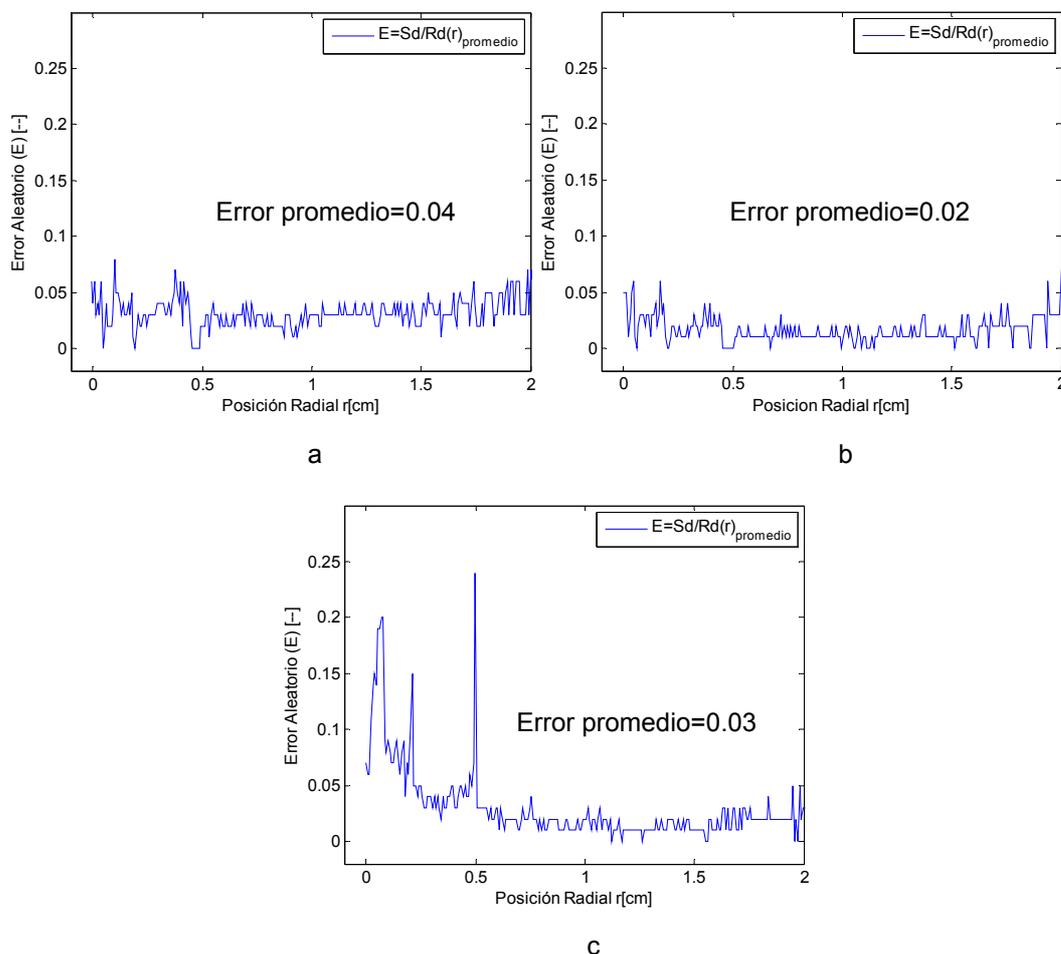


Figura 5.8 Error aleatorio (E) de las mediciones realizadas con la instalación experimental: a) y b) muestras de leche (Alpura Light 2000), c) phantom líquido conteniendo 30 ml de Lipofundin-10%.

5.3 RECUPERACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS CON CURVAS DE REFLECTANCIA DE PRUEBAS

Como se explicó en el Capítulo 2, en mediciones de la reflectancia difusa cercana a la fuente no es válida la teoría de la difusión, y más tratándose de que la fuente de luz láser aunque el haz es muy estrecho, no es lo suficiente como para ser considerada una fuente puntual [2]. Esta problemática fue analizada por Farrell *et al.* demostrando que para distancias mayores que $1 \text{ mfp}'$ es acertado el modelo teórico de la interacción luz- tejido, en la aproximación de la difusión [1]. Siendo por tanto consecuentes con ese

resultado, eliminamos los valores de la curva de reflectancia que no cumplan con esa condición dejando aquellos hasta una distancia radial de 2 cm como lo propone Jacques *et al.* [2].

Para evaluar la precisión de recuperación de los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} en dos muestras de tejidos sintéticos líquidos con los algoritmos de ajuste descritos en el acápite 4.3, se generaron un total de 10 curvas de reflectancia de pruebas (acápites 4.3.1) con errores aleatorios iguales a 0.03 y 0.05, respectivamente. Los parámetros ópticos de los tejidos usados en estas simulaciones se corresponden con las propiedades ópticas de un phantom de 112 ml conteniendo 15ml o 30 ml de Intralípido-10%, manteniendo μ_a constante (0.00292 cm^{-1}), $n=1.35$ y $g=0.7329$. A modo de ejemplo se muestra en la figura 5.9 un par de curvas de reflectancia de prueba para cada uno de estos tejidos con los dos errores aleatorios. Si se comparan con las curvas de reflectancia experimentales de la figura 5.7 (a-c), se observa que sus perfiles de intensidad son similares.

Los resultados del ajuste de las 10 curvas de reflectancia con el modelo analítico (ecuación 4.6 para $K=1$) se muestran en la tabla 5.4. En la primera columna se reflejan los nombres de los ficheros aleatorios que contienen los datos de la reflectancia difusa radial. Nosotros usamos la siguiente nomenclatura: A o B se refiere al phantom con coeficiente de esparcimiento igual a 64.21 cm^{-1} o 128 cm^{-1} respectivamente; el número 1 hasta 5 significa las 5 curvas de reflectancia simulando errores aleatorios iguales a 0.03 (índice 3) o 0.05 (índice 5). La precisión con que se recuperan μ_t' y μ_{eff} se midió a través del error relativo porcentual (Error). El algoritmo que usamos para recuperar esos coeficientes fue Bisquare/Levenberg-Marquardt con un criterio de convergencia en cuanto a la tolerancia permitida del valor de los coeficientes (ToIX) igual a 0.01 o 0.1. La calidad de estos ajustes se mide cuantitativamente a través de las expresiones numéricas SSE (suma de los cuadrados debido al residuo) y el RMSE (raíz del error cuadrático medio).

TABLA 5.3 Error relativo porcentual (Error) para la recuperación de las propiedades ópticas $\mu_t' = 17.15 \text{ cm}^{-1}$ (o 34.31 cm^{-1}) y $\mu_{\text{eff}} = 0.39$ (o 0.55), respectivamente, mediante el ajuste no lineal de las curvas de reflectancia de pruebas con el modelo analítico de Farrell *et al.* Se muestra los valores hallados para μ_t' y μ_{eff} y la calidad del ajuste a través de SSE y RMSE.

Ficheros	μ_t' [cm ⁻¹]	μ_{eff} [cm ⁻¹]	SSE [cm ⁻²]	RMSE [cm ⁻¹]	Error (μ_t') [%]	Error (μ_{eff}) [%]
A1_3.txt	17.15	0.39	0.0039	0.0045	0	0
A2_3.txt	17.15	0.39	0.0023	0.0035	0	0
A3_3.txt	17.15	0.39	0.0012	0.0025	0	0
A4_3.txt	17.15	0.39	0.0032	0.0041	0	0
A5_3.txt	17.15	0.39	0.0029	0.0039	0	0
A1_5.txt	17.15	0.39	0.0090	0.0068	0	0
A2_5.txt	17.15	0.39	0.0104	0.0073	0	0
A3_5.txt	17.15	0.39	0.0064	0.0058	0	0
A4_5.txt	17.15	0.39	0.0091	0.0069	0	0
A5_5.txt	17.15	0.39	0.0073	0.0062	0	0
B1_3.txt	34.31	0.55	0.0116	0.0077	0	0
B2_3.txt	34.31	0.55	0.0194	0.0100	0	0
B3_3.txt	34.31	0.55	0.0160	0.0091	0	0
B4_3.txt	34.31	0.55	0.0151	0.0088	0	0
B5_3.txt	34.31	0.55	0.0087	0.0067	0	0
B1_5.txt	34.31	0.55	1.7280	0.0941	0	0
B2_5.txt	34.31	0.55	0.0521	0.0163	0	0
B3_5.txt	34.31	0.55	0.0387	0.0141	0	0
B4_5.txt	34.31	0.55	0.0379	0.0139	0	0
B5_5.txt	34.31	0.55	0.0189	0.0098	0	0

De los resultados mostrados en la tabla anterior se observa que los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} se recuperan con un error relativo de un cero por ciento. Esto indica que con los errores aleatorios de nuestras mediciones experimentales se pueden recuperar las propiedades ópticas de los tejidos sintéticos preparados con coeficientes ópticos similares a los de la piel. Se

puede observar además que las magnitudes SSE y el RMSE son pequeñas comparadas con los valores de la reflectancia difusa la cual varía en cuatro órdenes a la distancia radial considerada. En la figura 5.10 se muestran sólo cuatro curvas ajustadas de los 20 archivos aleatorios que contienen la información de la reflectancia difusa radial dado que son muy similares entre sí.

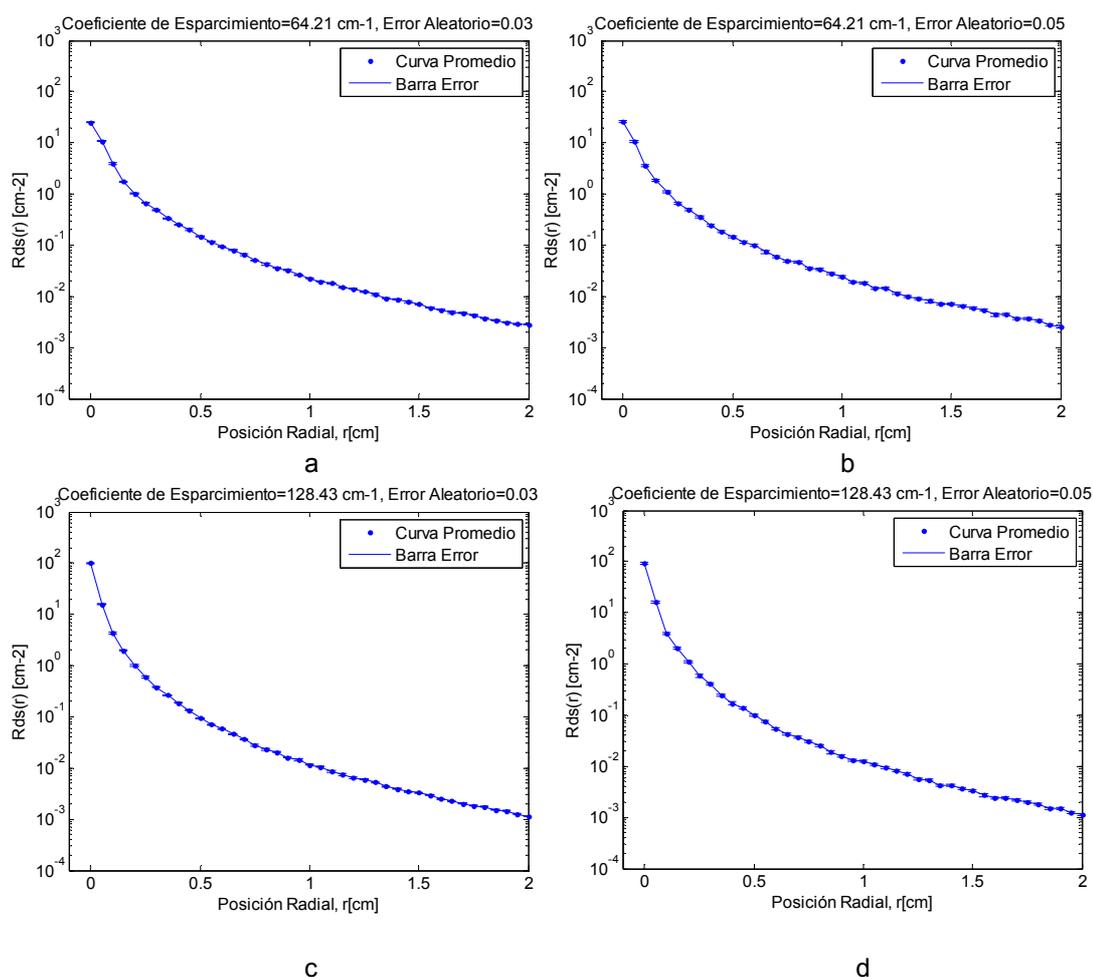


Figura 5.9 Curvas de reflectancia de pruebas simulando a los errores aleatorios experimentales y a las propiedades ópticas de los tejidos sintéticos líquidos: a) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.03$, b) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.05$, c) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.03$ y d) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.05$.

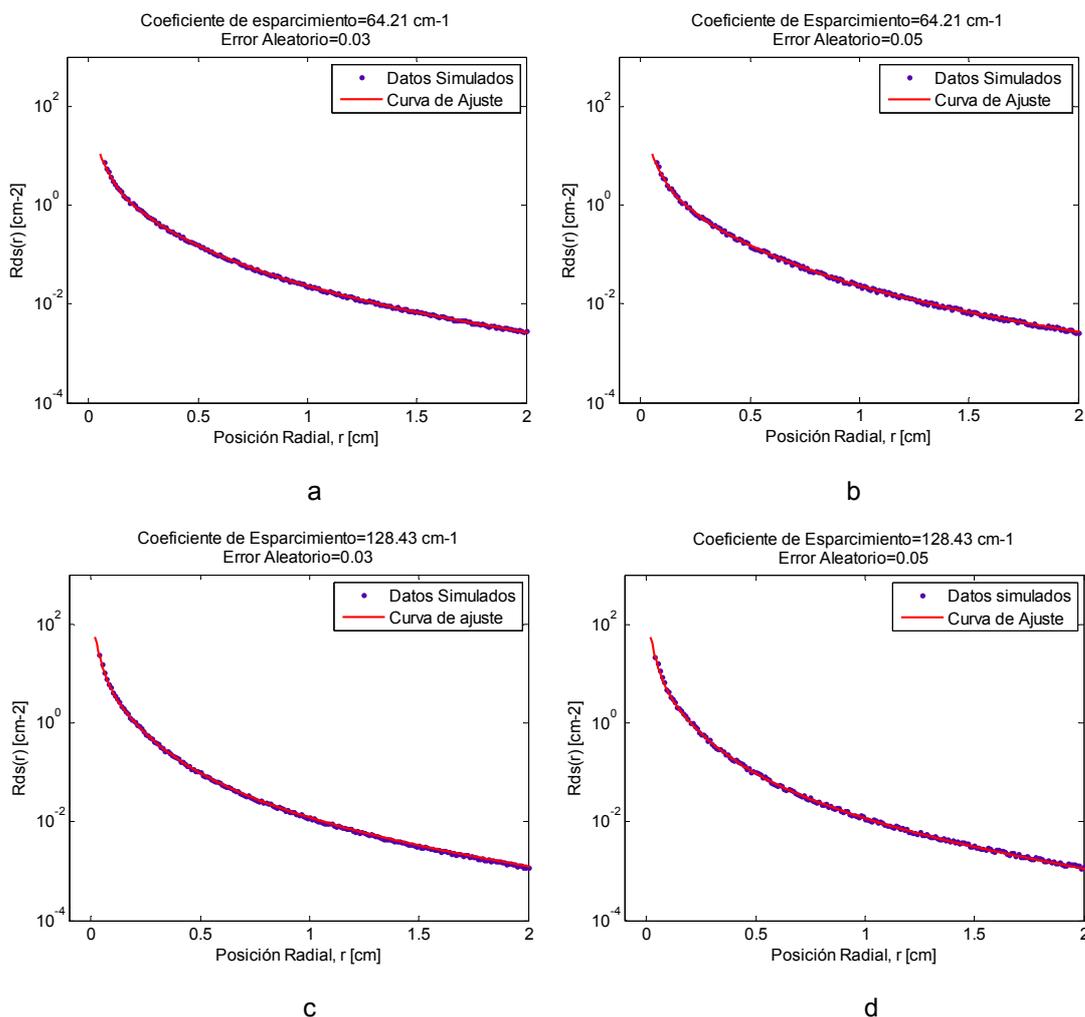


Figura 5.10 Curvas que ajustan los datos simulados, con la función analítica de Farrell et al: a) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.03$, b) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.05$, c) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.03$ y d) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.05$.

5.4 RECUPERACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS CON CURVAS DE REFLECTANCIA EXPERIMENTALES

Siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 4.3 para realizar el ajuste no lineal de los datos experimentales, se determinaron los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} en dos de las muestras de tejidos sintéticos líquidos usadas para calibrar la instalación experimental. Estas dos muestras de tejidos fueron aquellas conteniendo 15 ml y 30 ml de Lipofundin-10% (tabla 5.1). El

ajuste se realizó para dos distancias radiales diferentes que cumplieran las siguientes condiciones:

a) $1 \text{ mfp}' < r \leq 2 \text{ cm}$

b) $r_{\text{pivote}} < r \leq 2 \text{ cm}$; donde $r_{\text{pivote}} \approx 0.16 \text{ cm}$

Inicialmente calculamos el factor instrumental K realizando el ajuste lineal por mínimos cuadrados de $Rd(r)_{\text{Exp}}$ Vs $Rd(r)_{\text{Teo}}$ para cada una de estas distancias radiales. Como se puede observar en la figura 5.11, este factor K no es exactamente igual en las dos muestras de tejidos sintéticos, ni para las dos distancias radiales. Estas diferencias no deberían ocurrir si se conociera con precisión la reflectancia difusa radial obtenida teóricamente, $Rd(r)_{\text{Teo}}$, puesto que su curva de reflectancia se construye con los parámetros ópticos conocidos μ_a y μ_s' de estas muestras patrones. Como se explicó en el Capítulo 3, para calcular los parámetros ópticos de los phantoms preparados en este trabajo, supusimos como válidas las relaciones (3-1) y (3-2), por lo que sus propiedades ópticas se conocen sólo en una primera aproximación. De ahí la importancia de medir μ_a y μ_s' mediante el método de transmisión colimada y el método de absorbente añadido (acápite 3.2), corroborando una vez más la necesidad de contar con un estándar óptico para calibrar la instrumentación.

A pesar de saber que no es posible recuperar μ_t' y μ_{eff} con la exactitud ya definida a través de la simulación de las curvas de reflectancia con datos sintéticos, ajustamos los datos experimentales con la función analítica 4-6, sustituyendo el valor de K según le corresponde. Estos resultados se muestran en la tabla 5.4 y sus correspondientes curvas de ajuste en la figura 5.12. El algoritmo usado para recuperar las propiedades ópticas fue Bisquare/Levenberg-Marquardt con el criterio de convergencia TolX igual a 0.01. Como se observa el error relativo con que se recuperaron estos parámetros son menores para la muestra patrón con coeficiente de esparcimiento más pequeño (inferiores a un 2% para la recuperación de μ_t' e inferiores a un 8% para la recuperación de μ_{eff} , a la distancia radial mayor

que 1 mfp'), sin embargo para la muestra con el mayor coeficiente de esparcimiento no se recuperan los parámetros ópticos (100% para μ_{eff}) siendo este un indicio de que a mayor concentración del Lipofundin-10% en un volumen de 112 ml, sus parámetros ópticos definidos como conocidos se alejan más de la condición supuestamente válida en cuanto al valor de μ_s' (acápite 3.1.2).

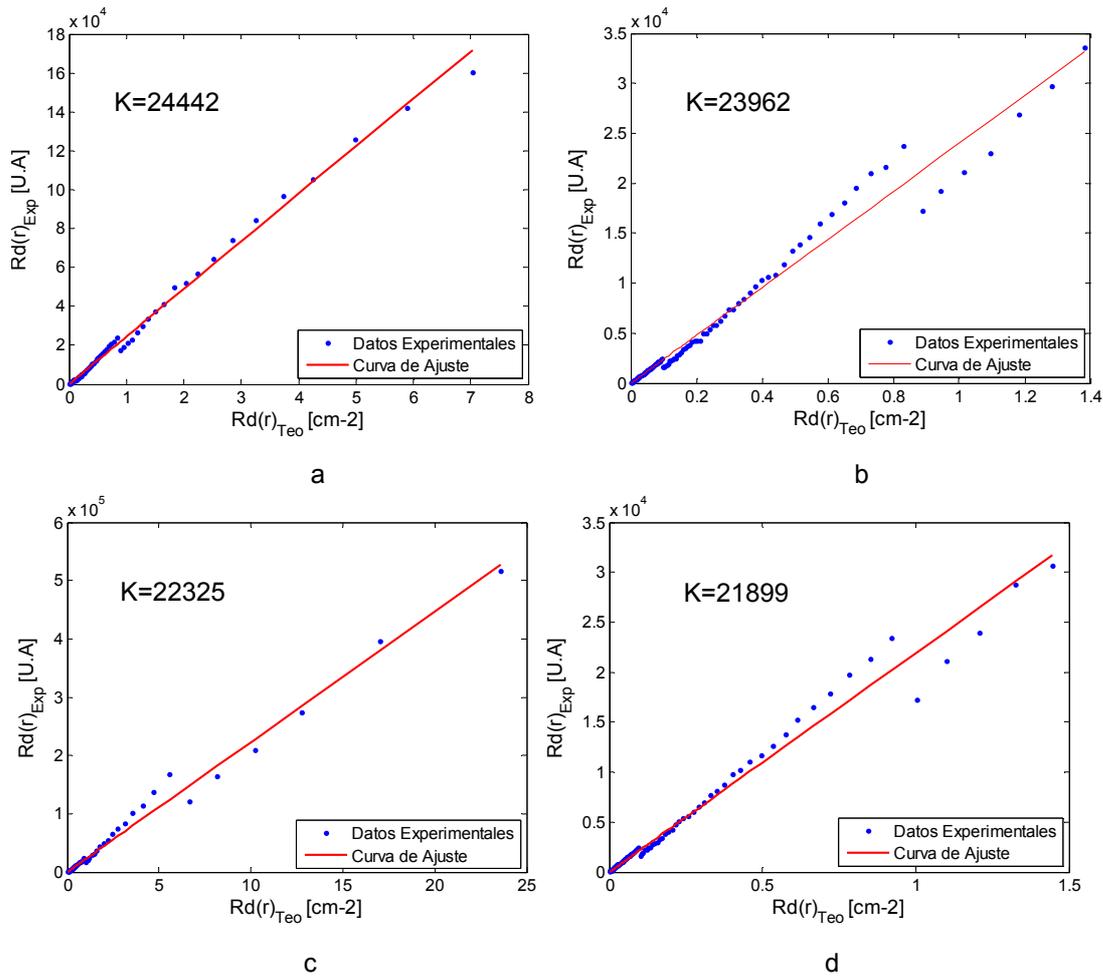


Figura 5.11 Determinación del factor instrumental K a través del ajuste lineal de la reflectancia difusa radial experimental con la reflectancia difusa radial teórica construida con las coeficientes ópticos conocidos de las muestras patrones: a) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $1 \text{ mfp}' < r \leq 2 \text{ cm}$, b) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $0.16 \text{ cm} < r \leq 2 \text{ cm}$, c) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $1 \text{ mfp}' < r \leq 2 \text{ cm}$ y d) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $0.16 \text{ cm} < r \leq 2 \text{ cm}$.

TABLA 5.4 Error relativo porcentual (Error) para la recuperación de las propiedades ópticas μ_t' y μ_{eff} , de dos muestras patrones mediante el ajuste no lineal de las curvas de reflectancia experimentales con el modelo analítico de Farrell *et al.* a dos distancias radiales, r.

μ_s [cm ⁻¹]	μ_t' [cm ⁻¹]	μ_{eff} [cm ⁻¹]	SSE [cm ⁻²]	RMSE [cm ⁻¹]	Error (μ_t') [%]	Error (μ_{eff}) [%]	
64.21	<u>1 mfp' < r ≤ 2 cm</u>						
		16.84	0.36	6.9X10 ⁶	167	1.81	7.69
	<u>0.16 cm < r ≤ 2 cm</u>						
		16.59	0.32	2.2X10 ⁶	98	3.27	17.95
128.43	<u>1 mfp' < r ≤ 2 cm</u>						
		33.76	30X10 ⁻⁵	9.9X10 ⁷	630	1.60	100
	<u>0.16 cm < r ≤ 2 cm</u>						
		31.72	65X10 ⁻⁴	1.4X10 ⁶	78	7.55	100

Como era de esperar, los valores hallados para los coeficientes a una distancia radial mayor que 0.16 cm, son diferentes, pues al ser K distinto, la función modelo cambia por ese factor.

En general los errores relativos reportados en la literatura [1-2, 4-5] para la recuperación de los coeficientes de esparcimiento reducido y de absorción en tejidos sintéticos a través de la medición de la reflectancia difusa resuelta espacialmente, se encuentran desde un 5 hasta un 13 por ciento. Sin embargo, aunque no conocemos las propiedades ópticas con exactitud de las muestras que usamos para calibrar nuestro arreglo experimental de Video Reflectometría, el procedimiento para la recuperación de los parámetros ópticos es el adecuado a pesar de errores relativos superior a los reportados por esos autores.

Corroboramos con estos resultados la importancia de medir μ_a y μ_s' con las técnicas experimentales de transmisión colimada y de absorbente añadido para poder contar con un estándar óptico durante el proceso de calibración de la instalación experimental.

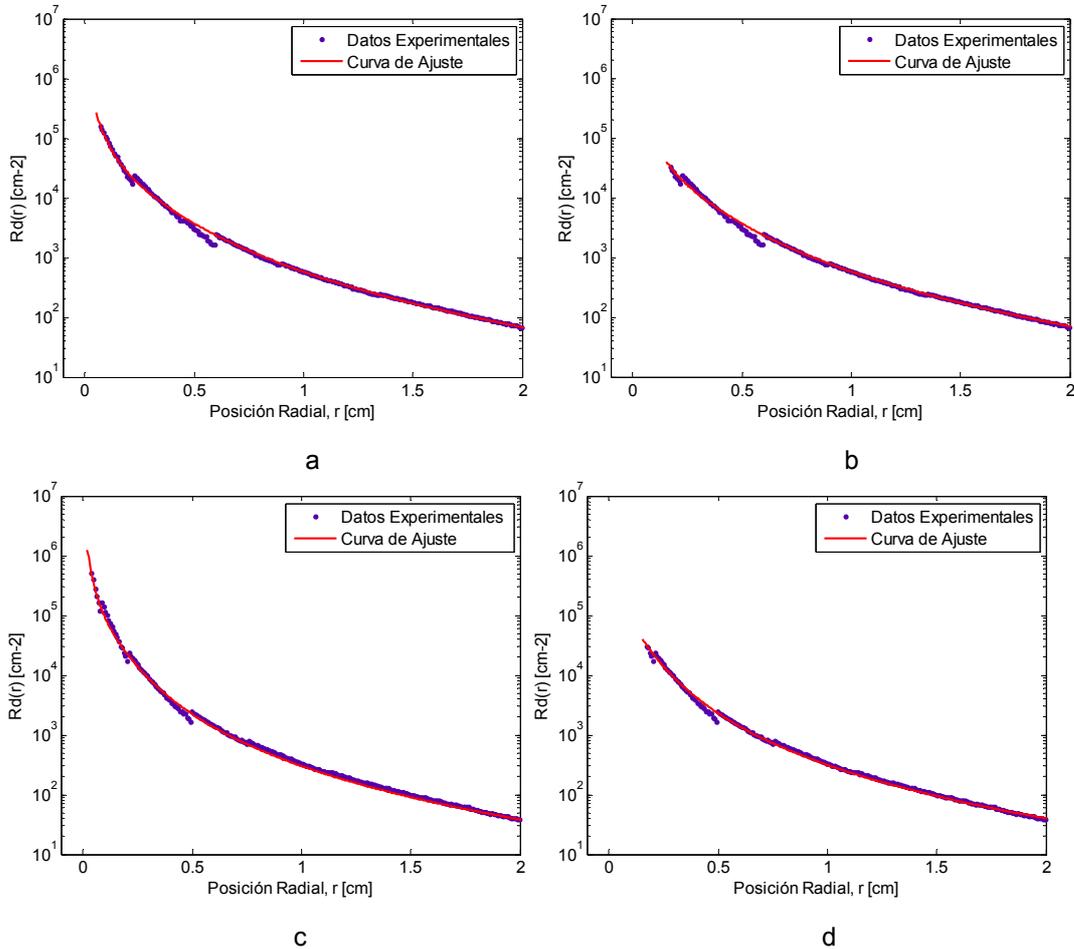


Figura 5.12 Curvas que ajustan los datos experimentales con la función analítica de Farrell et al: a) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $K=24442$, b) $\mu_s= 64.21 \text{ cm}^{-1}$, $K=23962$, c) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $K=22325$ y d) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $K=21899$.

5.5 RECUPERACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS CON LA MEDICIÓN DE LA REFLEXIÓN DIFUSA TOTAL.

La recuperación de los parámetros ópticos μ_a y μ_s de las muestras patrones, se pueden determinar también si a la vez que se realiza el registro de $R_d(r)$, se mide la reflexión difusa total, R_d , como describimos y explicamos en el acápite 4.2.2.

En la tabla 5.5 se muestra el resultado experimental de las mediciones realizadas para la reflexión difusa total en los cuatro phantoms descritos en la

tabla 5.1 y usando la relación 4-4. Una vez calculado Rd, Np se determina encontrando el valor donde se cumpla la condición de que la diferencia entre este Rd y el hallado teóricamente, sea cero. Escogiendo los valores extremos de Np como Np1=0 y Np2=2500 se encuentra visualmente que la función fzero (acápite 4.2.3) tiene una raíz, por tanto introduciendo estos valores en el argumento de la propia función se determina el valor de Np para el cual la diferencia anterior es cero. El valor del Np se muestra también en la propia tabla, observándose que aumenta con el valor de Rd como era de esperar debido a que el porcentaje de reflectividad de los phantoms aumentan con el coeficiente de esparcimiento.

TABLA 5.5 Resultados de las mediciones experimentales de la reflexión difusa total (Rd) en cuatro phantoms líquidos de 112 ml (Lipofundin-10%) con diferentes valores de μ_s' . Se muestra tanto al coeficiente de absorción como al coeficiente de esparcimiento reducido, según el valor del Np hallado experimentalmente.

μ_s' [cm ⁻¹]	M _{est} [mV]	M _m [mV]	Rd [--]	Np [--]	Np _{TEO} [--]	μ_a (Np) [cm ⁻¹]	μ_s' (Np) [cm ⁻¹]
17.15	0.2610	0.2290	0.8686	1243.8	5873.3	0.014	3.63
22.87		0.2330	0.8838	1628.8	7832.2	0.014	4.76
28.59		0.2350	0.8914	1886.8	9791.1	0.015	5.51
34.31		0.2370	0.8990	2070.0	11750.0	0.016	6.04

Nosotros supusimos que el coeficiente de absorción del Lipofundin-10% era aproximadamente igual al del Intralípido™ ($1.69 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) (acápite 3.1.2) por lo que despreciamos su valor frente al coeficiente de absorción del agua. Si calculamos el valor teórico de Np (Np_{TEO}) suponiendo que estas muestras tienen aproximadamente el coeficiente de esparcimiento reducido como lo hemos hallado y explicado a lo largo de este trabajo y con un coeficiente de absorción igual al de agua (0.00292 cm^{-1}), se obtiene que para cada muestra es muy diferente y superior al determinado experimentalmente como se observa en la tabla 5.5. Este resultado es un indicio que el coeficiente de absorción del Lipofundin-10% no es despreciable frente al del agua, y por

ende el valor promedio de μ_a de las muestras sería igual a 0.015 cm^{-1} , μ_a (Np). Si por el contrario mantuviéramos la hipótesis de que el valor de μ_a para el Lipofundin-10% es depreciable, entonces se podría recuperar el coeficiente de esparcimiento de cada muestra patrón. Al realizar estos cálculos se observa [μ_s' (Np)] que estos valores difieren apreciablemente entre sí.

Nosotros demostramos que los coeficientes de esparcimiento reducido anteriores, no son los verdaderos de las muestras patrones, o al menos aproximados. Esta demostración se hizo realizando el ajuste no lineal de dos curvas de reflectancia (phantoms conteniendo 15 ml y 30 ml de Lipofundin-10%) con la función modelo multiplicada por el factor instrumental K encontrado según estos nuevos parámetros ópticos (3.63 cm^{-1} y 6.04 cm^{-1}) y a la distancia radial de 1 mfp'. Los resultados de la mejor curva de ajuste encontrada arrojaron que el error relativo para la recuperación de μ_t' y de μ_{eff} en ambas muestras fue alrededor de un 13% y 100%, respectivamente, para un factor K de 39459 y de 84355. Como se puede observar, estos valores son muy distintos entre sí y con los obtenidos en el acápite anterior, lo que conduce a pensar que los nuevos coeficientes de esparcimiento reducido no son los más apropiados.

Con todos los resultados obtenidos a través de la medición de la reflexión difusa total en las muestras de tejidos preparadas por nosotros, nuevamente concluimos y corroboramos la importancia de medir μ_a y μ_s' con las técnicas experimentales descritas en el acápite 3.2 para poder contar con estándar óptico durante el proceso de calibración de nuestro arreglo experimental. No obstante, el procedimiento utilizado combinando la medición de la reflexión difusa total y la distribución del perfil de intensidad a una distancia radial r de la fuente, conforman un método alternativo que también permite recuperar los parámetros ópticos de las muestras de tejidos sintéticos líquidos cuyos coeficientes de absorción y de esparcimiento reducido son conocidos.

5.6 CONCLUSIONES

El arreglo experimental implementado en este trabajo de tesis en combinación con nuestro código de *Videoreflectometria.m* desarrollado en MATLAB®R2006a es una adecuada herramienta para el registro de la distribución lateral de la luz difusa en phantoms con propiedades ópticas similares a las de la piel humana, demostrándose que la dependencia experimental de $R_d(r)$ con el coeficiente de esparcimiento reducido está de acuerdo con los resultados teóricos esperados.

Se caracterizó la instalación experimental en cuanto a la repetibilidad de adquisición de la curva de reflectancia encontrando que la desviación estándar es aceptable para aplicaciones prácticas de esta técnica.

Se evaluó la precisión para la recuperación de los parámetros ópticos μ_t' y μ_{eff} con los algoritmos de ajuste no lineal en curvas de reflectancia de pruebas con datos sintéticos, demostrando que con los errores aleatorios de nuestras mediciones experimentales se pueden extraer las propiedades ópticas de los tejidos sintéticos líquidos preparados para calibrar la instrumentación. Estos coeficientes fueron determinados con los datos obtenidos experimentalmente de la curva de reflectancia en dos muestras de tejidos sintéticos líquidos, concluyendo que aunque el procedimiento del ajuste no lineal con el modelo analítico es el adecuado para recuperar los parámetros ópticos, sólo es posible obtener errores relativos inferiores a un 10% para μ_a y μ_s' , bien sea con este método o mediante la medición conjunta de la reflexión difusa total, si éstos se miden con la técnica experimental de transmisión colimada y de absorbente añadido para poder contar con un estándar óptico durante el proceso de calibración de la instalación experimental.

REFERENCIAS

- [1] T. J. Farrell, M. S. Patterson and B. Wilson, "A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties *in vivo*," *Med. Phys.* **19**, 879-888 (1992).
- [2] S. Jacques, A. Gutsche, J. Schwartz, L. Wang, and F. Tittel, "Video reflectometry to specify optical properties of tissue *in vivo*," in *Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring*, edited by G. Mueller, Proceedings of SPIE 1S11, 211-226 (1993).
- [3] . Ishimaru, "Diffusion approximation", in *Wave propagation and Scattering in Random Media*, eds (Academic Press, 1978), pp 175-190.
- [4] J. S. Dam, C. B. Pedersen, T. Dalgaard, P. E. Fabricius, P. Aruna, and S. Andersson-Engels, "Fiber-optic probe for noninvasive real-time determination of tissue optical properties at multiple wavelengths", *Appl. Opt.* **40**, 1155-1165 (2001).
- [5] M. G. Nichols, E. L. Hull, and T. H. Foster, "Design and testing of a white-light, steady-state diffuse reflectance spectrometer for determination of optical properties of highly scattering systems," *Appl. Opt.* **36**, 93-104 (1997).
- [6] J. Qin and R. Lu, "Hyperspectral diffuse reflectance imaging for rapid, noncontact measurement of the optical properties of turbid materials," *Appl. Opt.* **45**, 8366-8373 (2006).

Capítulo 6

Conclusiones

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

La distribución de la luz en los tejidos biológicos se caracteriza según las propiedades ópticas del medio por el cual se propaga la radiación óptica, por lo que es muy importante conocer a estas propiedades, antes de aplicar o desarrollar un método de diagnóstico óptico o de tratamiento con láser. En este trabajo de tesis arribamos a las siguientes conclusiones:

1. Durante el desarrollo de este trabajo se ha argumentado que del conjunto de técnicas basadas en la medición de la distribución lateral de la luz en los tejidos biológicos, la Video Reflectometría resulta ser atractiva para la determinación de los parámetros ópticos del tejido debido a las ventajas que presenta. Entre ellas se encuentran que se pueden medir los parámetros ópticos tanto en muestras *in-vivo* como *in-vitro*, además de ser una técnica relativamente simple, no invasiva y de no-contacto.
2. El marco teórico utilizado fue la teoría de la difusión y específicamente la formulación de Farrell que nos proporciona el modelo matemático adecuado para extraer las propiedades ópticas a partir de la medición de la reflectancia difusa lateral.
3. Se implementó de forma satisfactoria una instalación de Video Reflectometría basada en el uso de un láser como fuente de luz y una cámara CCD de 8 bit como detector. Esta instalación experimental fue

caracterizada en cuanto a la repetibilidad de adquisición de la curva de reflectancia, encontrándose que la desviación estándar resultante es aceptable para las aplicaciones prácticas que nos hemos trazado.

4. Se asimiló el estado actual de las técnicas para la preparación de los tejidos sintéticos empleándose las mismas en la confección de phantoms líquidos y sólidos a base de agar con el propósito de calibrar nuestro arreglo experimental.
5. Fueron desarrollados varios códigos fuente en el lenguaje de programación MATLAB®R2006a. Los principales se denominaron como: *Videoreflectometria.m* y *fzero_f2EXP.m*, que permitieron construir la curva de reflectancia resuelta espacialmente y encontrar el cociente
$$Np = \frac{\mu_s'}{\mu_a}$$
, respectivamente.
6. Se implementó y usó el concepto de generación de curvas de reflectancia sintéticas o de pruebas para evaluar el algoritmo de recuperación de los parámetros ópticos mediante el ajuste no lineal por mínimos cuadrados. Se obtuvieron resultados satisfactorios al recuperar los parámetros ópticos.
7. Se demostró que el procedimiento del ajuste no lineal por mínimos cuadrados de la curva de reflectancia experimental, con el modelo analítico de Farrell, es el adecuado para recuperar los parámetros ópticos del tejido en estudio.
8. Se corroboró que para calibrar el arreglo experimental de la Video Reflectometría es necesario contar con técnicas de medición de propiedades ópticas que nos garanticen la preparación de tejidos sintéticos controlados que actuarían como estándares ópticos.
9. Se han combinado e implementado las herramientas necesarias para determinar los parámetros ópticos de los tejidos biológicos a estudiar en nuestro laboratorio. Esto permitirá evaluar el cambio de los parámetros ópticos en dependencia de diferentes factores.

6.2 TRABAJO FUTURO

La técnica de Video Reflectometría para aplicaciones médicas de diagnóstico óptico o de tratamiento con láser en tejidos biológicos *in-vivo*, pudiera desarrollarse dentro de un equipo portátil y lo más económico posible. Este sistema se podría diseñar si se utiliza como fuente de luz la de un láser semiconductor colimado de 633 nm y de baja potencia (10 mW por ejemplo) y con un porta filtro rotatorio automatizado, con filtros neutros de densidad óptica conocidos y de pequeñas dimensiones. La cámara deberá usar una lente zoom cuya apertura numérica sea también conocida cuando se enfoque sobre la superficie de la muestra en estudio.

Los códigos elaborados durante el desarrollo de esta tesis deberán unificarse en un único programa de tal manera que se pueda realizar un software que entregue como resultado los parámetros ópticos del tejido en estudio, a partir de la curva de ajuste de los datos experimentales con el modelo analítico de Farrell.

Por último una parte del esfuerzo futuro debe dirigirse a elaborar estándares ópticos con propiedades ópticas conocidas, con el propósito de calibrar la instrumentación y determinar con precisión el factor (K) instrumental con la finalidad de recuperar las propiedades ópticas de estos estándares con errores del orden a los reportados en la literatura (inferiores a un 10%).

Apéndice A

Programa *Videorelectometria.m*

A continuación se presenta el programa de *Videorelectometria.m* desarrollado en MATLAB®R2006a con el que se puede generar la curva de reflectancia $R_d(\text{pixel})$ (ver acápites 4.2.1 y 5.1.2).

```
clear
%PRIMER INTERVALO DO4-DO3
f4=imread('DO4.bmp'); % leyendo la imagen correspondiente al filtro D04.
F4=mat2gray(f4); %convierte uint8 (arreglo de class double) a un arreglo de class
double scaled al rango [0,1].
G4=im2bw(F4); %divide cada valor de la entrada por 255.
[L4,num]=bwlabel(G4) %computa todas las componentes conectadas en una
imagen binaria. L4 se le conoce como matriz etiquetada.
[r,c]=find(L4==1); %computa el centro de masa de la imagen (centroide).
y=mean(r); %guarda en y, el valor del centroide que refiere a la fila.
x=mean(c); %guarda en y, el valor del centroide que refiere a la columna.
Y = round(y)
X = round(x)
In4=f4(Y,X:640); %matriz de intensidad de la imagen D04 leida desde X:640 por la
fila Y.
In4=In4';
[A,I]=max(In4<255); %encuentra la matriz de intensidad menor que 255, y el valor
máximo, y guarda en I el lugar que le corresponde en pixel contando desde el centro
X.
J=(I-1)+X; % valor correspondiente al centro de la imagen D04.
p=X:1:J; % vector que inicia la lectura de la imagen D04 desde su centro
f3=imread('DO3.bmp');% leyendo la imagen D03
In3=f3(Y,X:640); %matriz de intensidad de la imagen D03 leida desde X:640 por la
fila Y.
In3=In3';
```

```

[A3,I3]=max(ln3<255); %encuentra la matriz de intensidad menor que 255 y su valor
máximo, y guarda en I3 el lugar que le corresponde en pixel contando desde el
centro X.
J3=(I3-1)+X; % valor del pixel correspondiente con el primer número saturado de la
fila de la imagen D03, contando desde X.
% Escribe el primer intervalo en un fichero .txt
p1=X:1:J3; %vector que define el TRAMO SUPERIOR de la curva (primer tramo).
[m,n] = size(p1);
index1=m:1:n; %define un vector que inicia en m=1 hasta la dimensión de p1(n).
fid_w=fopen('intervalo1.txt','wt');
fprintf(fid_w,'%3d \n',ln4);
fid_w(close);      %%guarda en intervalo1.txt el primer tramo de la curva
%%DE AQUÍ EN LO ADELANTE SE REALIZA EL MISMO PROCEDIMIENTO
DESCRITO ANTERIORMENTE.
%SEGUNDO INTERVALO DO3-DO2
f2=imread('DO2.bmp');
ln2=f2(Y,X:640);
ln2=ln2';
[A2,I2]=max(ln2<255);
J2=(I2-1)+X;
%Escribe el segundo intervalo .txt
p2=(J3+1):1:J2;   %vector que define el segundo tramo de la curva
[m2,n2] = size(p2);
a=(J3+1)-X; %guarda en a, el valor que inicia al segundo tramo de la curva
M=m2+a; %guarda en M la distancia a+1
N=n2+a; %guarda en N el tamaño que define al segundo intervalo
index2=M:1:N; %vector que define el segundo intervalo de la curva
fid_w=fopen('intervalo2.txt','wt');
fprintf(fid_w,'%3d \n',ln3);
fid_w(close);
%TERCER INTERVALO DO2-DO1
f1=imread('DO1.bmp');
ln1=f1(Y,X:640);
ln1=ln1';
[A1,I1]=max(ln1<255);
J1=(I1-1)+X;
%Escribe el tercer intervalo .txt
p3=(J2+1):1:J1;   %vector que define el tercer tramo de la curva
[m3,n3] = size(p3);
b=(J2+1)-X;
M3=m3+b;
N3=n3+b;
index3=M3:1:N3;   %vector que define el tercer intervalo de la curva
fid_w=fopen('intervalo3.txt','wt');
fprintf(fid_w,'%3d \n',ln2);
fid_w(close);
%CUARTO INTERVALO DO1-DO0.5
f5=imread('DO0.5.bmp');
ln5=f5(Y,X:640);

```

```

In5=In5';
[A5,I5]=max(In5<255);
J5=(I5-1)+X;
%Escribe el cuarto intervalo .txt
p4=(J1+1):1:J5;   %vector que define el cuarto tramo de la curva
[m4,n4] = size(p4);
b4=(J1+1)-X;
M4=m4+b4;
N4=n4+b4;
index4=M4:1:N4;   %vector que define el cuarto intervalo de la curva
fid_w=fopen('intervalo4.txt','wt');
fprintf(fid_w,'%3d \n',In1);
fid_w(close);
%QUINTO INTERVALO DO0.5-DO0
f0=imread('DO0.bmp');
In0=f0(Y,X:640);
In0=In0';
[A0,I0]=max(In0<255);
J0=(I0-1)+X;
%Escribe el quinto intervalo .txt
p5=(J5+1):1:J0; %vector que define el quinto tramo de la curva
[m5,n5] = size(p5);
b5=(J5+1)-X ;
M5=m5+b5;
N5=n5+b5;
index5=M5:1:N5; %vector que define el quinto intervalo de la curva
fid_w=fopen('intervalo5.txt','wt');
fprintf(fid_w,'%3d \n',In5);
fid_w(close);
%SEXTO INTERVALO DO0 Sin filtro
%Escribe el sexto intervalo .txt
p6=(J0+1):1:640; %vector que define el sexto tramo de la curva
[m6,n6] = size(p6);
b6=(J0+1)-X;
M6=m6+b6;
N6=n6+b6;
index6=M6:1:N6; %vector que define el sexto intervalo de la curva
fid_w=fopen('intervalo6.txt','wt');
fprintf(fid_w,'%3d \n',In0);
fid_w(close);
%%GUARDA TODOS LOS INTERVALOS EN 1 UNICO FICHERO .txt y multiplica
cada valor de Rd(r) por su correspondiente factor de atenuación inverso (10^OD).
load intervalo1.txt -ascii;
data1=intervalo1;
data1_ext=data1(index1);
Rd=data1_ext(:,1);
a1=10^(4.041);   %10^(4)
Rd1=Rd*a1;
Z1=[Rd1];

```

```

fid=fopen('A.txt','wt');
fprintf(fid,'%12.0f\n',Z1);
fclose(fid);
size(data1_ext);
%%%%%%%%%%%%%%
load intervalo2.txt -ascii;
data2=intervalo2;
data2_ext=data2(index2);
Rd21=data2_ext(:,1);
a2=10^(2.982);      %10^(3)
Rd2=a2*Rd21;
Z2=[Rd2];
fid1=fopen('A.txt','rt+');
  for i=1:(n+1);
    line=fgetl(fid);
  end
fprintf(fid1,'%12.0f\n',Z2);
fclose(fid1);
size(data2_ext);
%%%%%%%%%%%%%%
load intervalo3.txt -ascii;
data3=intervalo3;
data3_ext=data3(index3);
Rd22=data3_ext(:,1);
a3=10^(2.012);      %10^(2)
Rd3=a3*Rd22;
Z3=[Rd3];
fid2=fopen('A.txt','rt+');
  for i=1:(n+n2+1);
    line=fgetl(fid);
  end
fprintf(fid2,'%12.0f\n',Z3);
fclose(fid2);
size(data3_ext);
%%%%%%%%%%%%%%
load intervalo4.txt -ascii;
data4=intervalo4;
data4_ext=data4(index4);
Rd23=data4_ext(:,1);
a4=10^(1.006);      %10^(1)
Rd4=a4*Rd23;
Z4=[Rd4];
fid3=fopen('A.txt','rt+');
  for i=1:(n+n2+n3+1);
    line=fgetl(fid);
  end
fprintf(fid3,'%12.0f\n',Z4);
fclose(fid3);
size(data4_ext);

```

```

%%%%%%%%%%
load intervalo5.txt -ascii;
data5=intervalo5;
data5_ext=data5(index5);
Rd24=data5_ext(:,1);
a5=10^(0.515); %10^(0.5)
Rd5=a5*Rd24;
Z5=[Rd5];
fid4=fopen('A.txt','rt+');
    for i=1:(n+n2+n3+n4+1);
        line=fgetl(fid);
    end
fprintf(fid4,'%12.0f\n',Z5);
fclose(fid4);
size(data5_ext);
%%%%%%%%%%
load intervalo6.txt -ascii;
data6=intervalo6;
data6_ext=data6(index6);
Rd25=data6_ext(:,1);
a6=10^(0);
Rd6=a6*Rd25;
Z6=[Rd6];
fid5=fopen('A.txt','rt+');
    for i=1:(n+n2+n3+n4+n5+1);
        line=fgetl(fid);
    end
fprintf(fid5,'%12.0f\n',Z6);
fclose(fid5);
size(data6_ext);
load A.txt -ascii;
data7=A;
L=length(data7) %defino el número de datos que tiene el fichero
%Ensamblando todas las curvas, resultando así el perfil de intensidad radial
Rd(pixel) de la zona de interés de la muestra:
semilogy(p1,data1_ext*a1,'m',p2,data2_ext*a2,'y',p3,data3_ext*a3,'g',p,data4_ext*a4
,'b',p5,data5_ext*a5,'k',p6,data6_ext*a6,'r'
axis([300 650 10 2000000])
xlabel('Posición radial [pixel]'), ylabel('Rd(pixel) [U.A]')
title ('Tejido Sintético Líquido...')
legend('Tramo 1','Tramo 2','Tramo 3','Tramo 4','Tramo 5','Tramo 6' )
%Se muestra el intervalo definido en cada tramo de la curva a través de n:
% tramo1=1,n
% tramo2=(n+1),(n+n2)
% tramo3=(n+n2+1),(n+n2+n3)
% tramo4=(n+n2+n3+1),(n+n2+n3+n4)
% tramo5=(n+n2+n3+n4+1),(n+n2+n3+n4+n5)
% tramo6=(n+n2+n3+n4+n5+1),(n+n2+n3+n4+n5+n6)

```

Apéndice B

Códigos para calcular el valor de N_p

Como se explicó en los acápites 4.2.3 y 5.5, una vez calculado el valor de la reflexión difusa total, R_d , en cada muestra de tejido, la relación $N_p = \frac{\mu_s'}{\mu_a}$ se determina, encontrando el valor donde se cumpla la condición de que la diferencia entre este R_d y el hallado teóricamente, sea cero.

A continuación presentamos los siguientes códigos elaborados en MATLAB®R2006a que permiten conjuntamente determinar el valor de N_p :

a) *f2EXP.m*

```
function f = f2EXP(Np)
RdE=0.8990; %[0.8686 0.8838 0.8914 0.8990]
n=1.35;
ri=0.668+0.0636*n+0.710/n-1.440/n^2;
A=(1+ri)/(1-ri);
T2=1./(3*(1+Np));
T1=3./(1+Np);
x1=(1/2)*exp(-sqrt(T1));
x2=1+exp(-4*A*sqrt(T2));
%RdT=x1.*x2;
a=(Np./(1+Np)) %albedo
RdT=(Np./(1+Np)).*x1.*x2 %multiplicando por el albedo
f= RdT-RdE;
```

b) *fzero_f2EXP.m*

```
%Graficando la función f=RdT-RdE Vs Np, con el fin de visualizar el intervalo donde
pueda encontrarse un cero para un RdE fijo:
%Np=[0:1:2500];
%RdE=0.8990;
%f1=f2EXP(Np);
```

```
%plot(Np,f1)
```

```
clear
```

```
RdE=0.8990; %[0.8686 0.8838 0.8914 0.8990]
```

```
raiz=fzero('f2EXP', [0 2500]) %Encuentra la raíz de la función f en el intervalo entre  
Np1=0 y Np2=2500. Este valor será igual al cociente de  $\mu_s'$  por  $\mu_a$ .
```

Apéndice C

Código *Genera_DatosSinteticos.m*

A continuación se presenta el código elaborado para generar curvas de reflectancia de pruebas (acápite 4.3.1) simulando tanto a los datos aleatorios de las mediciones realizadas como a los parámetros ópticos de los tejidos sintéticos usados para calibrar la instalación experimental de Video Reflectometría:

```
clear
r=0:0.01:2;
a=length(r);
%%%%%%%%%%Genera el signo positivo y negativo:
A=rand([1,a]);
A';
n=round(A');
L=(-1).^n
%%%%%%%%%%
Ngain=0.05; %error aleatorio de las mediciones realizadas
%%%%%%%%%%Simulando la reflectancia difusa lateral Rd(r):
n=1.35; %índice de refracción phantom IL-10%+H2O
mua=0.00292; %coeficiente de absorción del agua
g=0.7329; %factor de anisotropía del medio
mus=64.21; % coeficientes de esparcimiento: mus=[64.21 128.43];
musp=mus*(1-g); % coeficiente de esparcimiento reducido
mutp=mua+musp;
mueff=sqrt(3*mua*mutp);
ri=0.668+0.0636*n+0.710/n-1.440/n^2;
A=(1+ri)/(1-ri);
zo=1/(mua+musp);
D=zo/3;
delta=sqrt(D/mua);
r1=sqrt(zo^2+r.^2);
r2=sqrt((zo+4*A*D)^2+ r.^2);
```

```

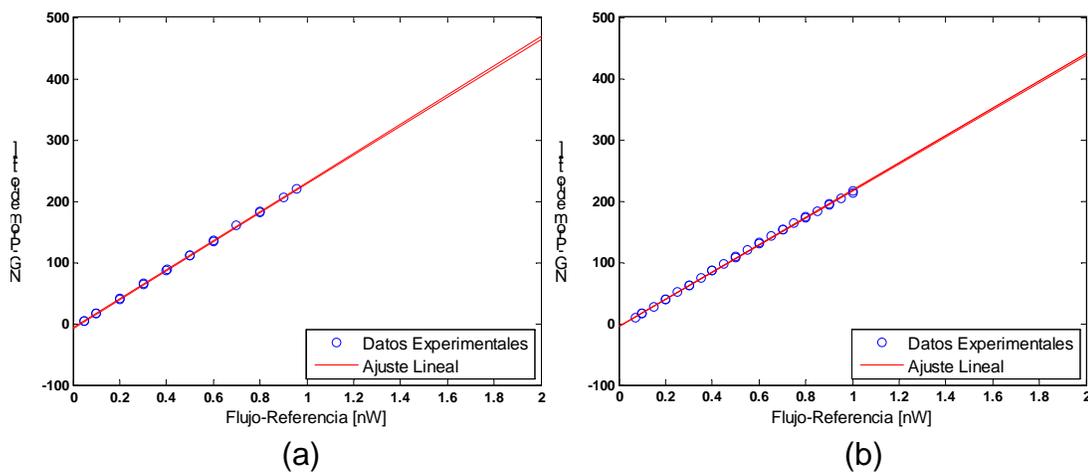
R2=zo*((1/delta)+(1./r1));
R3=(exp(-r1/delta))./r1.^2;
c1=R2.*R3;
R4=zo+4*A*D;
R5=(1/delta)+(1./r2);
R6=(exp(-r2/delta))./r2.^2;
c2=R4*R5.*R6;
c3=c1+c2;
Rd=((1/(4*pi))*c3);
Rd'
%%%%%%%%%%%%%%
ruido=(Ngain*Rd);
ruido1=ruido';
ruido2=L.*ruido1
sidma=ruido2';
%%%%%%%%%%%%%%
Rds=((1/(4*pi))*c3) + sidma;
Z1=[r;Rds];
fid=fopen('A4_5.txt','wt');
fprintf(fid,'%6.3f %12.8f\n',Z1);
fclose(fid);
semilogy(r,Rds,'b.')
hold on
errorbar(r,Rds,ruido,'b')
axis([-0.1 2 0.0001 1000])
xlabel('Posición Radial r[cm]'), ylabel('Rds(r) [cm-2]')
title ('Coeficiente de Esparcimiento=64.21 cm-1, Error Aleatorio=0.05')
legend('Curva Promedio', 'Barra Error')

```

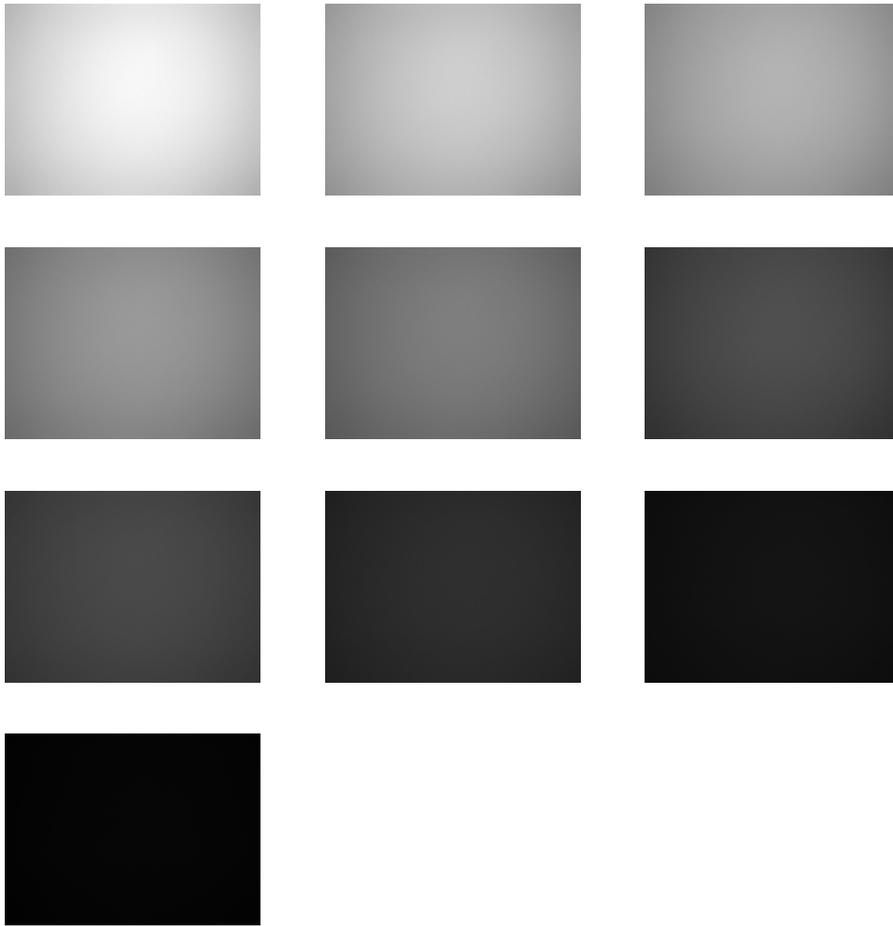
Apéndice D

Verificación de la linealidad de la CCD

Durante el proceso de verificación de la linealidad de la cámara CCD, a través de la instalación experimental propuesta en el acápite 4.4, se calculó el nivel de gris promedio en cada una de las imágenes registradas graficándose el flujo de referencia en función de estos niveles de gris. En las siguientes figuras se muestran el ajuste lineal de los datos experimentales para dos conjuntos de mediciones realizadas (a) y para tres conjuntos de mediciones (b), observándose la respuesta lineal de la CCD.



Una muestra de las imágenes capturadas según disminuye el flujo proporcional de referencia, se presenta a continuación sólo a modo de ilustración:



Lista de Figuras

Figura 2.1 Representación esquemática del flujo de energía, a través de un diferencial de área dA dentro de un diferencial de ángulo sólido unitario $d\Omega$	21
Figura 2.2 Elemento de volumen cilíndrico estacionario usado para deducir heurísticamente la ecuación de transporte.	22
Figura 2.3 Intensidad difusa $I_d(r,s)$ en la aproximación de la difusión. La línea gruesa horizontal es la interfase aire-medio turbio.	26
Figura 2.4 Diagrama que ilustra la aplicación de la condición de frontera aproximada usada en la aproximación de la difusión. La condición de frontera exacta es inaplicable en esta aproximación.	29
Figura 2.5 (superior) Centros de esparcimiento a lo largo del eje z , que representan fuentes puntuales isotrópicas en la ecuación de la difusión y luz reflejada difusamente a la distancia r de un haz de luz con incidencia normal a la superficie de un tejido homogéneo y semi-infinito. (inferior) Posición de la fuente imagen negativa, de una fuente puntual que se encuentra a una profundidad $z_0=1/\mu_{tr}$, con relación a la frontera extrapolada en $z_b=-2AD$ y a la frontera real del tejido en $-(2z_b+z_0)$	34
Figura 3.1 Imagen de las capas de la piel. Tomado de la Enciclopedia Médica en línea [16].	49
Figura 4.1 Fotografía de nuestra instalación experimental: 1) láser de He-Ne ($\lambda=632.8$ nm, $P_0=35$ mW), 2) porta filtro rotatorio conteniendo 5 filtros neutrales, 3) espejo delgado, 4) phantom líquido, y 5) cámara CCD para la toma de las imágenes luminosas por cada filtro.	62
Figura 4.2 Representación esquemática del perfil de intensidad de cada matriz correspondiente a los filtros de DO variable, leídas por la fila que	

contiene al centroide. Los puntos P3, P2, P1, PO.5 y PO representan los valores iniciales de los pixeles donde la imagen deja de ser saturada.	64
Figura 4.3 Fotografía de la instalación experimental para medir la reflexión difusa total: 1) láser de He-Ne, 2) porta filtro rotatorio colocado en la posición sin filtros neutrales, 3) espejo delgado, 4) phantom líquido, 5) cámara CCD, y 6) fotodiodo como detector para capturar una porción de la luz difusa total.	66
Figura 4.4 Comparación de la reflexión difusa total (RdT) para un medio acuoso con $n_{rel}=1.33$, entre la expresión analítica de Farrell et al. y la de Jacques, en función de N_p	68
Figura 4.5 Fotografía de la instalación experimental para verificar la linealidad de la CCD: 1) LED rojo, 2) lente plano-convexa, 3) filtro neutro de densidad óptica variable, 4) cubo divisor de haz a 45°, 5) lámina de difusora de vidrio, 6) cámara CCD, 7) cabezal de detección y 8) Radiómetro Digital.	75
Figura 5.1 Fotografía de los phantoms sólidos usados durante la caracterización de la instalación experimental de Video Reflectometría: (a, b, d, e) a base de agar con 15, 20, 25 y 30 ml de IVELIP-10%, respectivamente, c) muestra del gel de agar (1g/100 ml) y f) volumen cilíndrico de Teflón.	82
Figura 5.2 Imágenes tomadas durante el proceso de medición con la instalación de Video Reflectometría de incidencia normal (láser He-Ne, $\lambda=633$ nm): a) phantom líquido con $\mu_s'=34.31$ cm ⁻¹ b) imagen capturada con la CCD con el filtro neutro de DO=0.5.	83
Figura 5.3 Representación esquemática para determinar los tramos de la curva de reflectancia con las seis imágenes capturadas durante el proceso de medición con la instalación experimental comenzando la lectura a partir del centroide (C) calculado para la imagen con el filtro neutro de DO=4.	83
Figura 5.4 Curva de reflectancia obtenida como resultado del empalme de los 6 tramos o regiones de la curva habiendo multiplicado cada valor de Rd(pixel) por su factor de atenuación inverso (10^{OD}).	84

Figura 5.5 Reflectancia difusa radial $R_d(r)$ en phantoms líquidos, manteniendo constante el coeficiente de absorción y variando el coeficiente de esparcimiento reducido: a) curvas experimentales, b) curvas teóricas... 85

Figura 5.6 Reflectancia difusa radial $R_d(r)$ en phantoms sólidos a base de agar, manteniendo constante el coeficiente de absorción y variando el coeficiente de esparcimiento reducido..... 85

Figura 5.7 Curvas de reflectancia promedio y desviación estándar para caracterizar la instalación experimental en cuanto a la repetibilidad de las mediciones: a) y b) muestras de leche (Alpura Light 2000), c) phantom líquido conteniendo 30 ml de Lipofundin-10% y d) volumen cilíndrico de Teflón. ... 87

Figura 5.8 Error aleatorio (E) de las mediciones realizadas con la instalación experimental: a) y b) muestras de leche (Alpura Light 2000), c) phantom líquido conteniendo 30 ml de Lipofundin-10%. 88

Figura 5.9 Curvas de reflectancia de pruebas simulando a los errores aleatorios experimentales y a las propiedades ópticas de los tejidos sintéticos líquidos: a) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.03$, b) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.05$, c) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.03$ y d) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.05$ 91

Figura 5.10 Curvas que ajustan los datos simulados, con la función analítica de Farrell et al: a) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.03$, b) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.05$, c) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.03$ y d) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.05$ 92

Figura 5.11 Determinación del factor instrumental K a través del ajuste lineal de la reflectancia difusa radial experimental con la reflectancia difusa radial teórica construida con las coeficientes ópticos conocidos de las muestras patrones: a) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $1 \text{ mfp}' < r \leq 2 \text{ cm}$, b) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $0.16 \text{ cm} < r \leq 2 \text{ cm}$, c) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $1 \text{ mfp}' < r \leq 2 \text{ cm}$ y d) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $0.16 \text{ cm} < r \leq 2 \text{ cm}$ 94

Figura 5.12 Curvas que ajustan los datos experimentales con la función analítica de Farrell et al: a) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $K=24442$, b) $\mu_s=64.21 \text{ cm}^{-1}$, $K=23962$, c) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $K=22325$ y d) $\mu_s=128.43 \text{ cm}^{-1}$, $K=21899$ 96

Lista de Tablas

TABLA 4.1 Error relativo porcentual de N_p (con respecto a la formulación de Farrell et al.), calculado con la expresión analítica de Jacques y la de Farrell et al. para distintos valores simulados de la reflexión difusa total experimental (RdE), para un medio acuoso con $n_{rel}=1.33$	69
TABLA 5.1 Parámetros ópticos del phantom, para un volumen total de 112 ml conteniendo 15, 20, 25 o 30 ml de Lipofundin-10% (o del Ivelip-10%), calculados en $\lambda=633$ nm. Se consideró al coeficiente de absorción constante para todas las muestras e igual al del H_2O (0.00292 cm^{-1}) así como también al índice de refracción aproximadamente igual a 1.35. Para todas las muestras el factor de anisotropía del medio g es igual a 0.7329.	80
TABLA 5.2 Tabla comparativa entre los componentes de los Intralípidos usados con relación al IntralípidoTM (Kabivitrum, Stockholm).....	81
TABLA 5.3 Error relativo porcentual (Error) para la recuperación de las propiedades ópticas $\mu_t'=17.15\text{ cm}^{-1}$ (o 34.31 cm^{-1}) y $\mu_{eff}=0.39$ (o 0.55), respectivamente, mediante el ajuste no lineal de las curvas de reflectancia de pruebas con el modelo analítico de Farrell et al. Se muestra los valores hallados para μ_t' y μ_{eff} y la calidad del ajuste a través de SSE y RMSE.	90
TABLA 5.4 Error relativo porcentual (Error) para la recuperación de las propiedades ópticas μ_t' y μ_{eff} , de dos muestras patrones mediante el ajuste no lineal de las curvas de reflectancia experimentales con el modelo analítico de Farrell et al. a dos distancias radiales r	95
TABLA 5.5 Resultados de las mediciones experimentales de la reflexión difusa total (Rd) en cuatro phantoms líquidos de 112 ml (Lipofundin-10%) con diferentes valores de μ_s' . Se muestra tanto al coeficiente de absorción como al coeficiente de esparcimiento reducido, según el valor del N_p hallado experimentalmente.	97