



23  
2es

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MEDICION DE LA DENSIDAD OPTICA DE TEJIDOS HUMANOS

POR MEDIO DE TECNICAS ESPECTROSCOPICAS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
F I S I C O  
PRESENTA

VENERANDA GUADALUPE GARCES CHAVEZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR. ROBERTO ORTEGA MARTINEZ

CD. UNIVERSITARIA, MEXICO, AGOSTO DE 1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
CAPÍTULO 1. LA INTERACCIÓN DE LA LUZ CON EL TEJIDO BIOLÓGICO....	7
1.1. Introducción.....	7
1.2. Los efectos de la irradiación en el tejido.....	8
1.3. La Ley de absorción de Beer-Lambert.....	11
1.4. Las características del tejido biológico.....	15
1.5. Las características de absorción de la sangre..	17
1.6. Los modelos teóricos.....	18
1.7. Las aplicaciones en la medicina.....	20
CAPÍTULO 2. LA INSTRUMENTACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	23
2.1. Introducción.....	23
2.2. Las fuentes de radiación no-ionizante.....	24
2.2.1. La lámpara de halógeno-tungsteno.....	24
2.2.2. El láser de argón.....	25
2.2.3. El láser de colorante.....	26
2.3. Los detectores de luz.....	26
2.3.1. El fotomultiplicador.....	27
2.3.2. El fotodiodo.....	28
2.4. El Analizador Multicanal Optico (OMA).....	29
2.5. La instrumentación óptica.....	30
2.6. El fotómetro.....	31
2.7. El arreglo experimental y su calibración.....	32
2.7.1. La calibración del arreglo experimental.....	33
CAPÍTULO 3. EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y LOS RESULTADOS.....	36
3.1. Introducción.....	36
3.2. La densidad óptica en tejidos humanos in-vitro.	37
3.2.1. La preparación de las muestras de tejidos....	37
3.2.2. La medición de la densidad óptica en tejidos.	38
3.2.3. La medición de la densidad óptica aparente en tejidos humanos.....	43

3.3. La densidad óptica en las soluciones de sangre.	44
3.3.1. La preparación de las soluciones de sangre...	44
3.3.2. La medición de la densidad óptica en las soluciones de sangre.....	44
CONCLUSIONES.....	47
FIGURAS.....	51
TABLAS.....	55
GRÁFICAS.....	59
APÉNDICE A. La determinación de la densidad óptica.....	82
"    B. El flujo radiante en el fotomultiplicador.....	84
"    C. Glosario.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	87

## INTRODUCCION GENERAL

El desarrollo de los láseres y el actual uso de éstos en medicina, obliga a conocer la propagación de la luz láser en tejidos humanos para diversas aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

El principal problema es conocer la interacción de la radiación láser con el tejido humano para determinar el tipo de aplicación necesaria para cada láser y en su caso, desarrollar el láser adecuado para un tratamiento específico.

Desde el surgimiento de los láseres hace más de 30 años, múltiples aplicaciones han surgido tanto industriales como de desarrollo científico. Estas fuentes de radiación electromagnética son muy útiles por sus características de monocromaticidad, coherencia y direccionalidad. Existen láseres que emiten radiación en diferentes intervalos espectrales desde el ultravioleta (UV) hasta el infrarrojo (IR). Recientemente se está investigando el uso de los láseres en medicina, en particular en los siguientes campos de: cardiología, cirugía, dermatología, odontología, oftalmología, ortopedia y oncología.

La caracterización óptica del tejido humano es vital en el desarrollo de las aplicaciones médicas de los láseres. Las propiedades ópticas de tejido humano normal y patológico, no han sido totalmente caracterizadas hasta el día de hoy.

Por la importancia que existe en el desarrollo de las posibles aplicaciones médicas de los láseres, es de gran interés investigar algunas características físicas del tejido humano al momento de ser irradiado; para ello es necesario conocer primero las propiedades ópticas que presentan cada uno de los tejidos a la radiación láser o a cualquier otra fuente de radiación no ionizante.

Cuando la radiación láser incide en el tejido, dependiendo de las características propias de cada muestra y de la radiación, es absorbida, esparcida o reflejada. El tejido involucrado no es homogéneo y cada uno de sus componentes y estructuras contribuye a caracterizarlo ópticamete.

Desde hace aproximadamente 25 años se han propuesto un gran número de modelos físicos que predicen teóricamete las propiedades ópticas del tejido. Las aproximaciones de estos modelos se basan en las características y estructuras del tejido biológico y del tipo de radiación electromagnética con que son irradiados. La determinación de éstas propiedades ópticas en muestras biológicas es uno de los principales problemas que están en investigación hoy en día [Cheong, W. et al, 1990].

Los modelos teóricos proponen modelar la interacción de la luz con el tejido biológico. En ésta interacción láser-tejido lo más importante es el flujo de los fotones en el punto de incidencia en el tejido. El flujo absorbido en el tejido de estructura homogénea, es descrito por una función exponencial negativa dada por la Ley de Beer-Lambert. Debido a que el tejido no es homogéneo, normalmente existe un fuerte esparcimiento de luz en el medio irradiado, ésto ocasiona que el cálculo del flujo sea más complicado y que la Ley de Beer, en estos casos, deje de ser valida.

Actualmente la literatura reporta investigaciones de irradiación de luz sobre tejidos biológicos de animales y humanos; ésto tiene que ver con la similitud entre estos tejidos y, por supuesto, por la facilidad de experimentar *in-vitro* y posteriormente *in-vivo* con animales. En este trabajo nos abocaremos a la medición de la densidad óptica en tejidos humanos *in-vitro*.

La determinación de las propiedades ópticas es muy compleja debido a la gran variedad de tejidos humanos del mismo tipo, los cuales se caracterizan por su diversidad en la composición y organización de sus componentes biológicos. Así, la determinación de las propiedades ópticas que se presentan en el tejido cuando son irradiados con luz tienen un alto grado de incertidumbre.

Debido al alto contenido de sangre en tejidos humanos, el estudio de las propiedades ópticas de ésta es central en muchas aplicaciones biológicas y médicas que utilizan lámparas y láseres como fuentes de radiación. Las características de absorción, transmisión y esparcimiento de la luz por la sangre, tienen efectos en los diferentes usos terapéuticos y para propósitos de diagnóstico clínico, como por ejemplo en espectroscopia no invasiva del cerebro, corazón y órganos internos y en dosimetría usada en terapia fotodinámica para detección y tratamiento de cáncer.

El uso de varias técnicas espectroscópicas para probables aplicaciones en diagnósticos médicos, se han hecho cada vez más importantes en los últimos ocho años. Las investigaciones del comportamiento de la luz dentro del tejido nos conducen a un mejor entendimiento de los métodos espectroscópicos de fluorescencia que se están investigando recientemente [Andersson-Engels, S. et al, 1990].

La principal motivación de este trabajo es la medición de las densidades ópticas de tejidos humanos, para su caracterización con fines de dosimetría. Este trabajo se hizo con la colaboración de físicos del Laboratorio de Óptica Aplicada del Centro de Instrumentos de la Universidad Nacional Autónoma de México y médicos del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional, Siglo XXI del IMSS.

El trabajo consistió en medir, por medio de técnicas espectroscópicas, la transmisión y la reflexión de radiación no-ionizante en diferentes tejidos humanos y en soluciones de sangre humana disuelta en agua destilada para determinar la densidad óptica en tejidos humanos in-vitro en el espectro visible.

En el Capítulo I se explican los fenómenos y efectos que se llevan a cabo en la interacción de la luz con el tejido biológico. En particular, se consideran los fenómenos de absorción y esparcimiento en la irradiación de las muestras biológicas y las características que presentan éstas. Se exponen los diferentes modelos teóricos que se han propuesto para describir las propiedades ópticas de la interacción luz-tejido, así como las posibles aplicaciones en medicina.

El Capitulo II describe la instrumentación espectrofotométrica necesaria para el análisis de los fenómenos de transmisión y de reflexión en las muestras biológicas. Se mencionan algunas de las fuentes de radiación no-ionizante, los tipos de detectores, el analizador multicanal óptico, el fotómetro y la instrumentación óptica requerida en este tipo de técnicas espectroscópicas.

El Capitulo III explica el procedimiento experimental para la medición de las densidades ópticas de los tejidos humanos y de la sangre humana; desde la calibración del sistema espectrofotométrico hasta la preparación de las muestras. Se discuten y comparan los resultados experimentales obtenidos con los reportados en la literatura.

Para complementar el trabajo de tesis se incluyen las Conclusiones, Figuras, Tablas, Gráficas, Apéndices y la Bibliografía.



## CAPITULO 1

### LA INTERACCION DE LA LUZ CON EL TEJIDO BIOLÓGICO

#### 1.1. INTRODUCCION.

El uso de la radiación electromagnética ultra-violeta, visible e infrarroja en técnicas de diagnóstico y tratamiento para aplicaciones en medicina requieren de investigar la interacción de la radiación con el tejido biológico cuando éste es irradiado.

Cuando el tejido biológico es sometido a radiación electromagnética se llevan a cabo dos procesos: transmisión y reflexión, los cuales son afectados por los fenómenos de absorción y de esparcimiento.

El conocimiento de los efectos de absorción, esparcimiento, reflexión y transmisión son necesarios para tener una medición cuantitativa de la interacción luz-tejido biológico; por ejemplo, el fenómeno de absorción incrementa la temperatura del tejido al ser irradiado y esto da lugar a los efectos fototérmicos en el interior del tejido.

Los efectos fototérmicos, así como los efectos fotoquímicos y de fotodisrupción, dependen del tipo de radiación electromagnética incidente, ya sea continua o pulsada; de la longitud de onda de ésta y de las propiedades del tejido. Todos estos factores influyen en la distribución espacial de la radiación incidente en el tejido biológico.

Los láseres son comunmente usados para generar calor a través del proceso de absorción de luz por los diferentes constituyentes del tejido, este proceso puede producir fotocoagulación o vaporización en el tejido.

En este Capitulo se analizará la interacción de la luz en el tejido biológico para la medición de sus propiedades ópticas, en particular, la medición de la densidad óptica. Estas medidas son de primordial importancia para propósitos de aplicaciones médicas.

## 1.2. LOS EFECTOS DE LA IRRADIACIÓN EN EL TEJIDO.

La radiación de un haz que incide en la interface de dos medios, por ejemplo aire y tejido, puede ser absorbida, esparcida, reflejada o transmitida, dependiendo de las características del tejido y de la longitud de onda de la radiación.

La radiación que pasa del medio a una parte del tejido interactúa con los átomos y moléculas contenidas en éste. La naturaleza de la interacción puede variar dependiendo de las propiedades de la muestra.

La interacción de la luz con las muestras de tejido biológico da información esencialmente de dos procesos a primer orden: la transmitancia y la reflectancia, esto se debe a que la radiación que pasa a través de la muestra es afectada por dos importantes mecanismos llamados absorción y esparcimiento.

La absorción es la transformación que sufre la energía radiante en otras formas de energía al interactuar con la materia, por ejemplo, en energía calorífica.

En el proceso de absorción, la energía electromagnética es transferida a los átomos o moléculas que contiene la muestra, los cuales son excitados de sus estados de energía iniciales a estados de energía mas altos (estados excitados). Los átomos excitados o moléculas tienen una vida relativamente corta y tienden a regresar a su estado fundamental después de aproximadamente  $10^{-8}$  seg. Generalmente, la energía liberada aparece en el sistema como calor. Así, el aumento de calor en la muestra es debido únicamente a la luz que es absorbida por ésta. La eficiencia de convertir la energía de la luz a energía calorífica en un lugar determinado de la muestra depende de la absorción de la luz en ese punto.

El esparcimiento es la pérdida de la energía de un haz incidente a causa de la heterogeneidad del medio. Esta energía es subsecuentemente reemitida hacia todas direcciones en forma de luz. Este es el mecanismo físico fundamental que opera en la reflexión, refracción y difracción [Martellucci, S. et al, 1983].

El esparcimiento en el tejido se debe a las discontinuidades que presenta éste en el índice de refracción a nivel macroscópico, provocando el cambio de dirección de la energía de una onda incidente. Estos tejidos muestran heterogeneidades físicas debidas a la distribución de su estructura molecular.

La absorción y el esparcimiento de la luz irradiada determinan el flujo espacial en el tejido y los efectos biológicos subsecuentes en usos terapéuticos, como en terapia fotodinámica y en cirugía.

En algunos casos, sin embargo, las especies excitadas podrían experimentar un cambio químico que absorba la energía (reacción fotoquímica). En otros, la radiación puede ser reemitida (usualmente a mayores longitudes de onda) en forma de fluorescencia o fosforescencia.

El proceso de reflexión de la luz en la muestra, depende del ángulo de incidencia sobre ésta. La luz reflejada tiene dos componentes: la luz reflejada regular y la luz reflejada difusa. El ángulo de reflexión para la luz reflejada difusa es al azar y tiene una distribución uniforme. La reflectancia difusa ocurre primeramente en la interface aire-tejido.

Todas las aplicaciones biomédicas de los láseres están basadas en las interacciones de la luz láser con sistemas biológicos, éstas causan un gran número de efectos, los cuales pueden ser divididos principalmente en tres grupos diferentes. Primero, la luz láser de baja intensidad es absorbida, reflejada o reemitida (como fluorescencia) por la muestra, de manera que ningún cambio ocurre en ésta; estas interacciones forman la base para el diagnóstico láser (diagnóstico espectral de moléculas y macrodiagnóstico a nivel tisular. Segundo, la radiación de mediana intensidad de UV y visible puede excitar estados electrónicos en moléculas, causando efectos fotobiológicos específicos que ocurren debido a la excitación de cromóforos en células (endógenas o exógenas). Estos procesos también ocurren con luz de fuentes incoherentes, pero el uso de luz láser puede dar varios beneficios desde un punto de vista práctico en la fotomedicina y fotobiología

molecular. La tercera clase de efectos incluyen radiación láser de alta intensidad, lo cual causa daños en el tejido por destrucción mecánica-térmica o hidrodinámica; estos procesos, raramente observados con fuentes de luz incoherentes, forman la base de la cirugía láser.

Los principales efectos en la interacción láser-tejido son los fotoquímicos, fototérmicos y de fotodescomposición. Cualquiera de estos efectos pueden ser usados para remover tejido maligno por "digestión" biológica o ablación inmediata. Los efectos fotoquímicos tales como el fotodinámico y el de bioestimulación son observados en niveles de baja intensidad y consecuentemente con radiación continua.

La propagación de la luz dentro de materiales biológicos es regida principalmente por el esparcimiento y por la absorción; fenómenos que son producidos debido a los cromóforos, las proteínas de la sangre y al agua que contiene el tejido.

Es posible calcular la absorbancia de la luz total por el tejido mediante la medición de la intensidad de luz incidente y la luz transmitida utilizando la Ley de Beer, a pesar de que la distribución de la energía depositada no es constante en el tiempo debido a la conducción del calor. De esta manera se puede obtener en forma cuantitativa el coeficiente de absorción total  $\mu_t$  (o coeficiente de extinción) en cada muestra. Este coeficiente de atenuación del flujo promedio es la suma del coeficiente de absorción  $\mu_a$  y el coeficiente de esparcimiento  $\mu_s$ .

El coeficiente de absorción total describe la distribución del flujo real en el tejido, sobre todo en la región de la penetración óptica. La profundidad de penetración óptica es definida como el inverso del coeficiente de absorción total, y representa la distancia a la cual la potencia total del haz incidente es reducida a 37% [Nakamura, S. et al, 1990].

La profundidad de penetración de la luz, así como el coeficiente de absorción total en el tejido dependen de la constitución del mismo y de la longitud de onda de la luz con la que se irradia.

La absorción de la luz depende de la longitud de camino medio que la luz viaja en la muestra; y la longitud de camino medio depende del grado de esparcimiento, es decir, si hay mayor esparcimiento de algunos fotones, éstos tienen una longitud de camino medio mayor y así tienen más posibilidades de ser absorbidos a mayor profundidad.

En las longitudes de onda del láser de argón y, en general, en el intervalo espectral del visible, la luz esparcida es un factor dominante en el tejido fresco.

El desarrollo de la dosimetría de la luz, a diferencia de la dosimetría de radiaciones ionizantes en terapia de rayos X, requiere del conocimiento de los valores de las propiedades ópticas del tejido como son: la atenuación, absorción, esparcimiento y la distribución angular de esparcimiento simple, así como de los modelos cuantitativos de la propagación de la luz. Además, las propiedades ópticas dependen de la longitud de onda de la radiación electromagnética y de las características del tejido.

### 1.3. LA LEY DE ABSORCIÓN DE BEER-LAMBERT.

Cuando la intensidad de la luz  $I_0$  es transmitida a través de una muestra, la intensidad de salida  $I$  es menor que  $I_0$ . Para una muestra dada,  $I$  depende del espesor de acuerdo a la Ley de absorción de Beer:

$$I = I_0 \exp(-\mu_t L) \quad (1)$$

donde  $\mu_t$  es el coeficiente de absorción total (coeficiente de extinción), y  $L$  es el espesor de la muestra. El coeficiente de absorción total depende del coeficiente de absorción  $\mu_a$  y del coeficiente de esparcimiento  $\mu_s$ , de la siguiente manera:

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (2)$$

La Ec. 1 es la ley fundamental que gobierna la absorción de todo tipo de radiación electromagnética, es aplicable no tan solo a soluciones sino también a gases y sólidos. Esta ley es conocida por diferentes nombres: Ley de Beer-Lambert, Ley de Bouguer-Beer, Ley de absorción de Beer, o más comúnmente, Ley de Beer. En este trabajo se mencionará con el nombre de Ley de Beer, por simplicidad.

La Ley de Beer no se aplica directamente al análisis clínico, debido a que esta ley no es válida en problemas que envuelven procesos de esparcimiento múltiple encontrado en muestras biológicas heterogéneas.

La intensidad de luz incidente  $I_0$  y la intensidad de luz transmitida  $I$  por la muestra no pueden ser medidas fácilmente en el laboratorio, debido a que cada una de las muestras es colocada en algún recipiente o entre placas de vidrio, de manera que la interacción de la radiación con las paredes del recipiente es inevitable. Esto produce pérdidas en la potencia en cada interface como consecuencia de la reflexión o la posible absorción que sufra la radiación (Fig.1). En algunos casos el haz puede experimentar una disminución en la potencia a través de la muestra como un resultado del esparcimiento por moléculas grandes o por las inhomogeneidades de ella misma.

Para corregir estos efectos, la intensidad del haz transmitido a través de la muestra (tejido o sangre) es comparada con la intensidad del haz que pasa por el mismo sistema pero sin la muestra. De esta forma se puede obtener la luz transmitida únicamente debida a la muestra (ver Apéndice A).

La transmitancia es la fracción de la radiación incidente transmitida por la muestra, esto es:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

donde  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente e  $I$  es la luz transmitida por la muestra.

La transmitancia se relaciona con la densidad óptica, D.O., o también llamada absorbanza, A, de la siguiente manera:

$$A = D.O. = - \log (T) \quad (4)$$

de tal modo que de acuerdo con la Ec. 1 la densidad óptica resulta ser directamente proporcional con el espesor L de la muestra [Wilson, B.C. et al, 1990]:

$$D.O. = \frac{\mu_t L}{2.3} \quad (5)$$

La densidad óptica describe el grado de absorción de la muestra. En base a la Ec. 5, se puede ver que la densidad óptica es directamente proporcional al coeficiente de absorción total, el cual es una medida de la pérdida de luz del haz incidente (opacidad). En el tejido humano, una parte de la disminución de la intensidad se debe al esparcimiento ocasionado por glóbulos rojos y por la absorción (Fig.2).

La atenuación del haz incidente en una muestra puede ser expresada en términos de la densidad óptica; aunque, la absorción y el esparcimiento contribuyan a la atenuación de la luz. Considerando esparcimiento simple en una solución diluida la Ley de Beer puede ser usada para calcular la transmisión de la solución en la dirección de la luz incidente [Ishimaru, A. et al, 1983]. En este caso la Ley de Beer es válida solamente en soluciones diluidas. En este aspecto, la Ley de Beer está limitada.

Se consideran soluciones altamente concentradas aquellas mayores de 0.01, es decir, mayores en una proporción de 1 en 100. A estas concentraciones, cada una de las partículas responsables de la absorción interactúa con sus vecinas y así cada una afecta la distribución de carga de las partículas que la rodean. Esta interacción puede alterar la habilidad o la facilidad de las partículas de absorber una longitud de onda de la radiación de luz incidente. La interacción depende de la concentración de la muestra, y esta interacción causa desviaciones en la relación lineal entre absorbanza y concentración. Si estos cambios en la concentración de

la muestra causan diferencias significativas en el índice de refracción de ésta, entonces también esto ocasiona desviaciones o incumplimiento en la la Ley de Beer [Skood, D.A., 1971].

La Ley de Beer describe la distribución de la luz en el tejido en una sola dirección, de tal manera, que no considera el esparcimiento anisotrópico, ni la contribución de la luz esparcida por el flujo total, el cual es descrito en tres dimensiones.

Esta ley se puede aplicar para medir la transmitancia o la absorbancia de los tejidos siempre y cuando se consideren tejidos cuyo esparcimiento de la radiación sea menor que la absorción.

La reflectancia,  $R$ , es la fracción de la intensidad incidente reflejada por la muestra, en una sola longitud de onda o sobre un intervalo espectral; la cual esta representa de la siguiente manera:

$$R = \frac{r}{r_0} \quad (6)$$

donde  $r_0$  es la intensidad de luz incidente y  $r$  es la intensidad de luz reflejada por la muestra.

La reflectancia,  $R$ , se relaciona con la medida de la densidad óptica "aparente",  $D.O._a$ , dada por la siguiente ecuación:

$$D.O._a = -\log_{10}(R) \quad (7)$$

En la reflectancia, al igual que para la transmitancia,  $r_0$  es la medida de la luz reflejada por el solvente y  $R$  es la luz reflejada por la muestra (ver Apéndice A). Ambas mediciones se hacen exactamente con las mismas condiciones experimentales.

Para un material descrito por la Ley de Beer, una gráfica de densidad óptica contra espesor de la muestra da una línea recta, con pendiente proporcional al coeficiente de absorción, Ec.5. Cuando la longitud de la radiación se aproxima al tamaño del objeto o cuando existen inhomogeneidades en el medio, se presenta el fenómeno de esparcimiento dejando de ser válida la Ley de Beer.



#### 1.4. LAS CARACTERISTICAS DEL TEJIDO BIOLÓGICO.

En general, el medio en el cual una onda viaja puede ser considerado determinístico (como una guía de ondas) o azaroso (como el océano o la atmósfera).

El tejido puede ser considerado como un medio inhomogeneo por su variabilidad en el tiempo y el espacio, consecuentemente la propagación de las ondas fluctúan en amplitud y fase. En estas condiciones se utilizan promedios estadísticos y densidades de probabilidad para la descripción de las ondas.

La propagación de las ondas en medios inhomogeneos puede ser agrupada en tres categorías:

1. "Ondas con esparcidores al azar", distribución al azar de muchas partículas que facilitan el esparcimiento como las partículas en el océano o los glóbulos rojos en la sangre.
2. "Ondas en medios inhomogeneos continuos", son medios cuyas características varían al azar y continuamente en tiempo y espacio, como por ejemplo el aire y el tejido biológico.
3. "Esparcimiento de superficies rugosas" tales como las interfaces entre las diferentes capas del tejido biológico [Martellucci, S. et al, 1983].

La distribución espacial y la intensidad de la luz esparcida en el medio dependen del tamaño y de la forma de las partículas esparcidoras, de la longitud de onda de la luz incidente y de la diferencia en el índice de refracción debido a las inhomogeneidades del medio. Para partículas con dimensiones del orden de un décimo de la longitud de onda, el esparcimiento es generalmente débil e isotrópico y sus intensidades varían inversamente a la cuarta potencia de la longitud de onda. Esto es conocido como el esparcimiento Rayleigh.

Para partículas cuyo tamaño sean del mismo orden de magnitud de la longitud de onda incidente, el esparcimiento es grande y dirigido hacia adelante de la dirección de la radiación. En cambio, cuando las partículas esparcidoras son mucho más grandes que la longitud de onda de la luz incidente, el esparcimiento es débil pero fuertemente dirigido hacia adelante; esto es conocido como el esparcimiento Mie.

La propagación óptica en materiales biológicos es altamente dominada por esparcimiento, debido a lo heterogéneo del tejido biológico, lo cual es consecuencia de la diversidad de células que lo componen, las cuales son del orden de una longitud de onda óptica.

El esparcimiento múltiple ocurre cuando las partículas son expuestas no tan solo a la luz del haz original sino también a la luz esparcida y atenuada por otras partículas, es decir, existe esparcimiento múltiple cuando las partículas interactúan con sus vecinas.

Para entender la interacción de la luz con el tejido biológico, es importante conocer algunas características de las células y tejidos en el cuerpo humano. Hay células de todos tamaños y formas pero generalmente su diámetro es de algunas micras. Las células del músculo son de unos pocos milímetros, mientras que algunas células nerviosas son del orden de un metro de largo. Las células agrupadas y combinadas con otro material forman el tejido. Hay cuatro tipos de tejidos básicos: epitelial, conectivo, muscular y nervioso. Cada uno tiene propiedades ópticas específicas, las cuales deben ser caracterizadas individualmente.

Por el alto contenido de sangre en algunos tejidos fue necesario analizar la D.O. de la sangre (hemoglobina) en función de la longitud de onda.

### 1.5. LAS CARACTERISTICAS DE ABSORCION DE LA SANGRE.

La sangre es una suspensión de elementos celulares que contiene en su mayor parte sal y proteínas de plasma, siendo los glóbulos rojos (eritrocitos) el componente celular más importante, ocupando más de 600 veces el volumen de varios tipos de glóbulos blancos. El plasma sanguíneo tiene muy baja absorción en el infrarrojo cercano y en el visible del espectro. Desde una perspectiva del esparcimiento óptico, es razonable considerar a la sangre como una mezcla de los glóbulos rojos en un medio transparente de plasma sanguíneo.

La hemoglobina es la principal causante de la absorción de la luz en la sangre: absorbe principalmente la luz azul, verde y amarilla y en menor proporción la luz roja.

Considerando el fenómeno de absorción, es de esperarse que en la parte del espectro del ultra-violeta el coeficiente de absorción  $\mu_a$  fuese mayor debido a la alta absorción en este intervalo espectral característico de muchas biomoléculas tales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Cuando se incrementa la longitud de onda, esta absorción decrece y la absorción debido a los cromóforos específicos tales como la hemoglobina, mioglobina, bilirrubina y melanina aumenta. En este intervalo de longitudes de onda podríamos esperar ver diferencias más grandes en el  $\mu_a$  entre diferentes tipos de tejidos cuando el contenido de los cromóforos variará considerablemente; una vez que la longitud de onda aumenta más allá de 1000nm, la absorción a la luz infrarroja por el agua se convierte en el mecanismo dominante y podríamos esperar que el coeficiente de absorción de muchos tejidos sean tan grandes como el del agua (ver Gráfica 1).

En las longitudes de onda del visible y cercano infrarrojo, la absorción de la luz en la sangre es principalmente determinada por la concentración y la saturación de oxígeno en la hemoglobina, de tal modo que cualquier variación fisiológica cambia las propiedades ópticas de los glóbulos rojos alterando la absorción y el esparcimiento de la luz en la sangre.

## 1.6. LOS MODELOS TEORICOS.

Numerosos modelos han sido reportados en la literatura, éstos predicen el flujo de la luz en el tejido, o la reflexión y transmisión de la luz por el tejido. En cualquier caso, para la evaluación del promedio del flujo de la energía en un medio, los parámetros ópticos del material irradiado deben ser conocidos, llamados comunmente como coeficiente de absorción  $\mu_a$ , coeficiente de esparcimiento  $\mu_s$  y una distribución angular de esparcimiento simple (g). Los parámetros ópticos son obtenidos al convertir medidas de cantidades observables (por ejemplo, la reflexión) en parámetros que caracterizan la propagación de la luz en el tejido.

Existen varios problemas en las medidas experimentales: las suposiciones en los modelos, medidas técnicas, aparatos experimentales, esquemas de calibración y las heterogeneidades biológicas en el tejido.

La mayoría de los resultados obtenidos de las propiedades ópticas del tejido se basan en la teoría de transporte radiativo. La ecuación de transporte radiativo puede describir la distribución de la luz en tejido con esparcimiento y absorción en tres dimensiones y toma en cuenta las pérdidas de la luz en cada punto. También, considera la ganancia en el flujo en cada punto debido al esparcimiento de los puntos vecinos dentro del tejido. La ecuación de transporte tiene solamente una solución analítica en una geometría unidimensional. Para conseguir una solución en dos o tres dimensiones, es necesario restringir la distribución angular de la luz esparcida. Una solución alternativa a esta ecuación puede ser obtenida usando el Método de Monte Carlo; éste calcula un camino azaroso para cada fotón y lo sigue hasta que es absorbido. La solución de Monte Carlo ha sido implementada en un programa de computadora por Keijzer. Esta implementación de la ecuación de transporte da una muy buena estimación de la distribución de la luz cuando el tejido es irradiado con fuentes de luz láser [Gourgouliatos, Z.F. et al, 1992].

Una aproximación a la teoría de transporte radiativo es la teoría de difusión. En la teoría de difusión los fotones son tratados como partículas, las cuales son esparcidas y absorbidas en el medio óptico. Esta teoría considera que cada partícula esparcidora está lo suficientemente alejada de sus vecinos para evitar esparcimiento múltiple y que las partículas que absorben o esparcen la luz están distribuidas uniformemente al azar por todo el medio. La aproximación de difusión da expresiones analíticas de reflectancia y transmitancia; esta aproximación suele aplicarse a tejido delgado o tejido que tiene una gran variedad de propiedades ópticas y geometrías complejas [Hasegawa, Y. et al, 1991]. Las propiedades del tejido describen la propagación de la radiación en tres dimensiones, en la teoría de difusión la propagación radial es frecuentemente reducida a una dimensión en la profundidad de penetración.

Estos métodos llamados métodos de esparcimiento múltiple han sido frecuentemente usados para tratar de entender la interacción de la irradiación con estructuras biológicas.

Cabe mencionar que la mayoría de los métodos computacionales para medir los coeficientes de absorción y de esparcimiento y la distribución angular, requieren de la medida del espesor de una muestra uniforme y tres cantidades ópticas, tales como la reflexión total, la transmisión total o difusa y la transmisión colimada. Típicamente estas cantidades son medidas usando una esfera integradora en el sistema.

Aunque en capas muy delgadas de tejido biológico (menores de 1mm de espesor), o muy cerca de la superficie, el esparcimiento de la luz no es isotrópico. Más allá de una profundidad de 1mm puede ser usada la ecuación de difusión para describir la distribución de la luz en el tejido considerando los esparcidores de luz isotrópicos.

## 1.7. LAS APLICACIONES EN LA MEDICINA.

El láser de argón es uno de los láseres mas potentes de radiación continua en el visible y su campo de aplicación abarca la biomedicina. Este láser se propuso para ser usado en angioplastia, principalmente por que la radiación puede ser conducida a través de fibra óptica, por la buena absorción que se obtiene y por los niveles de potencia disponibles.

Los láseres de colorante son fuentes de radiación coherente, sintonizable, y de gran versatilidad. Son instrumentos muy usados desde la investigación básica, como la física y la química, hasta la medicina e industria. Combinando diferentes técnicas como la espectroscopia.

Para el diagnóstico de cáncer la longitud de onda de 630nm del láser de colorante (R6G con DCM), con derivados de hematoporfirina como un fotosensibilizador, es usada en terapia fotodinámica. El uso de la luz verde con la luz roja ha sido propuesta para la terapia fotodinámica debido a que la luz verde es más efectiva para excitar la hematoporfirina [Van Staveren, H.J. et al, 1991].

Los láseres son usados clinicamente de manera rutinaria en muchas especialidades médicas y quirúrgicas. Además, son usados en la investigación de nuevas aplicaciones en medicina.

Los efectos que la radiación óptica tiene en el tejido pueden ser separados en categorías que dependen de la parte del espectro que incide sobre el tejido y la intensidad de la radiación.

La parte ultravioleta del espectro (100 a 400nm) tiene principalmente un efecto fotoquímico más que un efecto de reacción térmica sobre el tejido. En la irradiación de la luz, estas longitudes de onda rompen ligaduras intramoleculares y son capaces de crear incisiones en el tejido.

Los láseres que emiten en la región ultravioleta como el de Excímero y el de Nd:YAG (3° y 4° armónico de la frecuencia característica), han sido usados para efectos de fotoablación y fotodisrupción, respectivamente.

Existen muchos efectos en tejidos humanos con irradiación de luz visible (400 a 700nm), los cuales, frecuentemente son medidos por la absorción de la radiación por varios pigmentos en el tejido. Los pigmentos de absorción importantes incluyen la melanina en la piel, coroides del ojo y en alguna otra parte del cuerpo humano; y la hemoglobina. Si la intensidad de la radiación es grande, la energía absorbida es convertida en exceso de calor y puede causar daños térmicos. El efecto térmico de la luz en el tejido depende de la longitud de onda del haz incidente y de las características de absorción del tejido.

Algunos de los láseres que emiten en la región visible son los siguientes:

-Argón, capaz de emitir en las longitudes de onda azul y verde. Es usado especialmente para los efectos de fotocoagulación.

-Kriptón, emite en el amarillo-rojo. Se usa para fotocoagulación, principalmente por oftalmólogos.

-Helio-Neón, emite en el rojo, es usado como haz de guía para los láseres no visibles.

-Láseres de colorante (Dye), emiten en el espectro visible dependiendo del colorante seleccionado como medio activo. Los láseres de colorante son excitados por el láser de Argón, Kriptón o Nitrógeno. Son usados clínicamente en terapia fotodinámica.

En el infrarrojo cercano (700 a 3000nm), la energía electromagnética puede causar quemaduras en la piel y en la retina. En el lejano infrarrojo (3000 a 10000nm) los efectos están limitados a las capas superficiales del tejido. El láser CO<sub>2</sub>, que emite en el 10600nm, es fuertemente absorbido por el agua.

La energía depositada en el tejido es el producto de la potencia del láser y el tiempo que el haz esté incidiendo en una área del tejido. La duración de la exposición de la energía sobre el tejido es una variable importante para controlar los efectos en el tejido, éstos podrían ser vaporización del tejido (transformación de los componentes sólidos y líquidos del tejido a vapor), o una coagulación térmica controlada. Alguno de los efectos no deseados podría ser una necrosis por coagulación excesiva.

Otros factores que determinan los efectos de la radiación óptica incluyen el suministro de la sangre circulando, lo cual refresca el tejido, el calor específico y la conductividad térmica de varios tejidos.

La caracterización óptica del tejido es vital para el desarrollo de aplicaciones médicas de los láseres. Estas aplicaciones incluye la incisión láser (corte) de tejido suave, la unión láser (o soldadura) de tejido, la esclerosis láser y la ablación de los cálculos biliares.



LA INSTRUMENTACION ESPECTROFOTOMETRICA

2.1. INTRODUCCION.

En este Capítulo se explica la instrumentación requerida para llevar a cabo las mediciones de las densidades ópticas de las muestras de tejidos biológicos.

Las técnicas espectrofotométricas requieren de un sistema que esté constituido por una o varias fuentes de radiación, un monocromador, elementos ópticos como espejos y lentes y/o fibras ópticas para transmitir la radiación, un sistema de detección de la radiación electromagnética, finalmente, un sistema para la adquisición de los datos. En esta parte cabe mencionar que la facilidad de transmitir la radiación a través de fibras ópticas ha contribuido afortunadamente a la extensión de las áreas de aplicación.

Un espectrofotómetro es un dispositivo que permite hacer mediciones de la distribución espectral de la intensidad de luz.

La medición del flujo de luz en el interior de una muestra, se hace de dos maneras diferentes: (1) medidas directas con un instrumento apropiado o (2) descripción externa por medio de modelos teóricos. Desafortunadamente ambos métodos pueden dar resultados inciertos. Las medidas inciertas in situ necesitan detectores de luz cuya inserción en el tejido no altere la distribución del flujo de luz y cuya respuesta no dependa de la dirección con la que entra la luz. Todavía no ha sido desarrollada completamente la óptica que cumpla con estos requisitos; aunque recientemente, como un instrumento apropiado, se está usando una fibra óptica incrustada en un bulbo de material que difunde la luz.

## 2.2. LAS FUENTES DE RADIACION NO-IONIZANTE.

Las fuentes de radiación electromagnética deben, primero: generar un haz con suficiente potencia para poder detectarlo y traducirlo a una señal eléctrica; segundo: las fuentes deben ser de radiación continua, esto es, el espectro debe contener todas las longitudes de onda sobre la región en la cuál ésta va a ser usada; finalmente, es necesario que la fuente sea estable; la potencia del haz radiante debe permanecer constante durante el periodo necesario para medir la intensidad de luz incidente  $I_0$  y la luz transmitida  $I$  (o reflejada), sólo en estas condiciones fueron reproducibles las medidas de la densidad óptica. Algunos instrumentos están diseñados para medir  $I_0$  e  $I$  simultáneamente; en este caso, las fluctuaciones en la fuente radiante no presentan ningún problema.

Como fuentes de radiación se usaron una lámpara de halógeno-tungsteno y los láseres de argón y de colorante (rodamina 6G).

La lámpara de tungsteno es usada por su intervalo espectral continuo y los láseres por su monocromaticidad y coherencia. Estos láseres emiten radiación continua.

### 2.2.1. LA LAMPARA DE HALOGENO-TUNGSTENO.

La fuente más común de radiación visible es una lámpara de filamento de tungsteno. Las lámparas de halógeno-tungsteno son fuentes de radiación continua todo el intervalo espectral del visible, lo que permite obtener la relación de la densidad óptica de la muestra en este intervalo.

La distribución de energía de esta fuente se aproxima a la de un cuerpo negro. La Fig. 3 muestra las curvas de emisión de lámparas de diferentes filamentos, en particular es de notarse el filamento de tungsteno a  $3000^{\circ}\text{K}$ . En la mayoría de los instrumentos de absorción la temperatura del filamento de operación es de  $2870^{\circ}\text{K}$ ; la mayor parte de

la energía es emitida en la región del IR. Una lámpara de filamento de tungsteno es usada para el intervalo de longitudes de onda entre 320 y 2500nm.

### 2.2.2. EL LASER DE ARGON.

La palabra LASER es un acrónimo de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation", amplificación de la luz por radiación de emisión estimulada. El desarrollo de los láseres desde 1960 ha sido extremadamente rápido y aunque sus aplicaciones tuvieron un inicio muy lento durante su primera década, nuevas aplicaciones de radiación láser están siendo encontradas día con día.

Las características de la luz láser son la direccionalidad, monocromaticidad, coherencia, potencia, facilidad de enfoque y de sintonización. Además, los láseres tienen la capacidad de emitir su energía en forma de pulsos cortos o en forma continua.

Los láseres emiten radiación con una alta direccionalidad. El haz colimado tiene un pequeño ángulo de divergencia. Esto es importante, ya que significa que la energía llevada por los láseres puede ser colectada fácilmente y enfocada en una área pequeña. La característica principal de la radiación láser es que ésta tiene la más alta radiancia que cualquier otra fuente de luz. La radiancia es la potencia por unidad de área por unidad de ángulo sólido. Además en los láseres de colorante es posible sintonizar la longitud de onda en un intervalo grande.

Por estas características los láseres son fuertemente recomendables en aplicaciones médicas, particularmente por su confinamiento espacial de daño térmico inducido ópticamente. Los láseres han sido usados como un instrumento para controlar destrucción de tejido. En cirugía, por ejemplo, para inducir cambios térmicos. La radiación láser puede también ser usada para inducir reacciones fotoquímicas in-vivo.

Un láser de argón es una cavidad óptica con gas de argón ionizado como medio activo. Este haz se encuentra en el espectro de luz visible, en el azul y verde. Las líneas de emisión discretas del láser de argón tienen las longitudes de onda siguientes: 457.9, 476.5, 488.0, 496.5, 501.7 y 514.5nm.

### 2.2.3. EL LASER DE COLORANTE.

Un láser de colorante, es un láser que contiene en el medio activo un colorante orgánico líquido. Los láseres de colorante emiten en el espectro de luz visible y algunos pueden ser sintonizables ajustando la radiación de excitación y el medio del colorante.

El láser de colorante, Dye, es bombeado ópticamente con un láser de argón y tiene un filtro birrefringente para sintonizar las frecuencias de oscilación particulares. Emite radiación en un intervalo espectral continuo desde 572-620nm con un pico máximo en el 593nm (espectro de fluorescencia de la R6G, Gráfica 2).

### 2.3. LOS DETECTORES DE LUZ.

La luz transmitida o reflejada es introducida en el monocromador y detectada en la rendija de salida de éste, ya sea por un fotomultiplicador, por un fotocátodo o por el analizador multicanal óptico.

Los detectores producen una señal electrónica (corriente o voltaje) en respuesta a la energía radiante. Por esta razón se puede medir fácilmente la energía antes y después de ser irradiada la muestra.

En el campo de la detección de señales de bajo nivel se han alcanzado grandes progresos. Aparte de los nuevos fotomultiplicadores con un extenso intervalo de sensibilidad espectral y una eficiencia cuántica (>20%), se han desarrollado nuevos instrumentos de detección tales.

como los amplificadores de imagen, los detectores de luz infrarroja o los analizadores multicanal ópticos. Para muchas aplicaciones espectroscópicas estos detectores han sido extremadamente útiles [Demtröder, W., 1982].

### 2.3.1. EL FOTOMULTIPLICADOR.

Los fotomultiplicadores son detectores que tienen: un cátodo fotoemisor, un sistema de dinodos donde los efectos de la emisión secundaria proporcionan la amplificación de la corriente del cátodo y un ánodo que colecta los electrones a la salida del sistema de dinodos, produciendo una salida en forma de corriente del ánodo. La característica más importante del fotomultiplicador es el sistema de dinodos, que consiste de electrodos cubiertos con material especial que proporcionan una emisión secundaria. La emisión secundaria se refiere al hecho de que los electrodos emiten varios electrones "secundarios" después del impacto de un electrón "primario". El número de electrones secundarios emitidos por cada electrón primario incidente depende de la energía cinética de este electrón primario.

Los fotomultiplicadores son los detectores más sensibles a la luz, por ahora, con una área grande sensible y pueden ser usados para contar fotones a razón de 100 fotones por segundo [Grum, F., 1979].

La respuesta típica espectral del fotocátodo S4 del fotomultiplicador 1P21 con una ganancia típica de aproximadamente  $3 \times 10^6$  a  $22^\circ\text{C}$  se muestra en la Gráfica 3a, donde se puede apreciar que prácticamente cubre todo el espectro visible y parte del ultravioleta (300-630nm).

El fotomultiplicador produce una salida de corriente proporcional a la intensidad de la luz, la cual es enviada a un fotómetro (Recording Photometer). La lectura de la señal es proporcional al flujo de luz incidente, la lectura es mostrada en forma analógica. El fotómetro acepta señales de corriente del fotomultiplicador y muestra la amplitud de la señal en el medidor.

La respuesta del fotomultiplicador depende del voltaje de polarización eléctrica y de la ganancia de operación (Garcés, V. et al, 1992). Las causas de la no linealidad en la respuesta pueden principalmente ser:

1. El uso de bajos voltajes de operación y altas corrientes en el ánodo.
2. Si no se irradia todo el área del cátodo, la parte no irradiada actúa como una serie de resistencias, las cuales causan una caída de voltaje. Así que en este caso, la no linealidad es una función del tamaño y la posición del área irradiada.

### 2.3.2. EL FOTODIODO.

El fotodiodo de silicio es usado desde el cercano ultravioleta hasta el cercano infrarrojo.

La respuesta espectral de algunos fotodiodos de silicio se muestran en la Gráfica 3b. La longitud más alta donde el detector todavía es sensible es la de  $1100nm$ , esto se debe a la energía de "bandgap" del silicio puro.

En longitudes de onda cortas el decrecimiento rápido se debe al aumento en la absorción de estas longitudes por el silicio antes de que los fotones puedan llegar a la unión p-n.

Los fotodiodos tienen una respuesta en frecuencia de Gigahertz. Estos detectores combinados con los amplificadores operacionales dan una respuesta lineal con una ganancia alta sobre grandes intervalos de frecuencia [Grum, F., 1979].

#### 2.4. EL ANALIZADOR MULTICANAL OPTICO (OMA).

El Analizador Multicanal Optico, "Optical Multichannel Analyzer" (OMA) es un arreglo de 1024 fotodiodos colocados paralelamente uno respecto del otro con una ventana activa de 2.54cm, la respuesta espectral de los fotodiodos se extiende de 180-910nm, siendo prácticamente constante en el intervalo del visible (ver Gráfica 4, IRY-S/RB). Las ventajas de estos detectores son su capacidad de monitorear y adquirir simultáneamente en forma digital el espectro de entrada.

El arreglo de fotodiodos lineales "self-scanned photodetector", SPD, (detectores de auto-barrido) ha sido específicamente diseñado como un detector espectrométrico paralelo. Un SPD de arreglo lineal de fotodiodos es un circuito integrado de gran escala fabricado sobre un cristal de silicio monolítico simple. Este contiene una fila de fotodiodos de 25 $\mu$ m junto con un circuito de barrido para tener una señal secuencial de salida. Los diodos son restablecidos completamente en tiempos menores a 1 $\mu$ s.

Todos los detectores con recubrimiento de silicio estan sujetos a corriente oscura generada térmicamente y son asociadas a fluctuaciones estadísticas (ruido); todos estos efectos, no obstante, pueden ser significativamente reducidos enfriando el arreglo. La corriente oscura en estos tipos de detectores es dividida a la mitad cada vez que la temperatura es reducida 6.7°C. Es recomendable usar un enfriador termoeléctrico a -25°C para lograr el enfriado del detector [Talmi, Y. and Simpson, R.W., 1980].

Un espectrómetro multicanal colecta simultáneamente la energía dispersada en un número de canales (diodos) con cierta longitud de onda. La energía de cada canal podrá ser colectada por un elemento detector discreto de un arreglo de detectores.

El detector del sistema OMA, de 700 canales activos, con el que cuenta el Laboratorio de Optica Aplicada puede operar con radiación incidente continua o pulsada. Tiene un tiempo de entrada ("GATE TIME") mínimo de

50-120ns con algunos efectos de iris. Este detector tiene una ganancia de  $5 \times 10^6$ , por lo que es usado en varias aplicaciones de bajo nivel de luz incluyendo: Raman, fluorescencia, fosforescencia, luminiscencia, espectroscopia de láser pulsado, análisis de plasma, diagnóstico de láser, etc. El intervalo dinámico del detector es 16384:1 (14 Bits).

## 2.5. LA INSTRUMENTACION OPTICA.

El arreglo espectrofotométrico cuenta con la instrumentación óptica necesaria para enfocar, transmitir, reflejar y colectar la radiación proveniente de los láseres y de la lámpara de halógeno-tungsteno.

Las fibras ópticas de cuarzo y atados de fibras de vidrio fueron utilizadas para transmitir y colectar la luz. Una fibra óptica es una varilla de cuarzo (o de vidrio) transparente cubierta con un revestimiento de un material con densidad óptica menor. La diferencia en el índice de refracción entre los dos materiales permite que la luz viaje a través de ellas, manteniéndose confinada en las mismas [Treviño, C. et al, 1991].

Para seleccionar las longitudes de onda presentes en la irradiación de las muestras se utilizó un monocromador. Un monocromador es un dispositivo que selecciona la luz en una banda estrecha de longitudes de onda de un haz de luz en el cual un intervalo de longitudes de onda están presentes. Para una rejilla de 1200l/mm y de 150l/mm, la longitud de onda  $\lambda$  del resplandor (blaze) está en 500nm en ambos casos. La precisión en la longitud de onda del monocromador para estas rejillas es de  $\pm 0.1nm$  y  $\pm 0.8nm$  y tienen una reproducibilidad de  $\pm 0.005nm$  y  $\pm 0.4nm$ , respectivamente.

Una rejilla de difracción es un vidrio o una superficie de metal pulida sobre la cual hay un gran número de surcos o rendijas paralelas finamente cortadas. Estos elementos paralelos son usados para difractar la luz, generalmente separadas y extendidas por diferentes longitudes de onda o colores.



Las rejillas de difracción son usadas en equipos espectrográficos (espectroscopios, espectrofotómetros, monocromadores, espectrómetros, etc.) como el elemento óptico principal para separar la luz en sus longitudes de onda que la componen (frecuencias) y difractarlas a diferentes ángulos. Las rejillas son también usadas en algunos láseres que son capaces de emitir radiación coherente a más de una longitud de onda, para seleccionar la longitud de onda a la salida de éste.

Las muestras de tejido para ser irradiadas son colocadas en portaobjetos y cubreobjetos de vidrio plano y las soluciones de sangre en una cubeta (Hellma Cells, Inc., modelo 131-OS) con paredes planas de cuarzo.

Se usan las cubetas de cuarzo si se requiere trabajar en el intervalo espectral del UV abajo de  $350\text{nm}$ ; este material es también transparente en el espectro visible y hasta  $3\mu\text{m}$  en el intervalo de luz infrarroja IR. El vidrio puede ser empleado en el intervalo de  $350\text{nm}$  a  $2\mu\text{m}$  y cubetas de plástico para el intervalo del visible [Skood, D.A., 1971].

En general todos los elementos ópticos involucrados en el sistema espectrofotométrico experimental deben estar hechos de materiales que deje pasar la radiación en el intervalo espectral de interés, en este caso el intervalo visible.

## 2.6. EL FOTOMETRO.

El fotomultiplicador produce una salida de corriente proporcional a la intensidad de la luz incidente, la cual es enviada a un fotómetro de la marca Recording Photometer, modelo 17. La lectura de la señal de la luz es en forma analógica. El fotómetro acepta señales de corriente del fotomultiplicador y muestra la amplitud de la señal en el medidor. El instrumento tiene la opción de cancelar la corriente oscura. El medidor tiene tres escalas; las primeras dos son lineales (0- $30\mu\text{A}$  y de 0- $100\mu\text{A}$ ). Estas escalas son usadas en transmitancia, fotometría de bajo nivel, medidas de fluorescencia y luminiscencia, etc.; la tercera escala es el logaritmo del recíproco de la escala de 0- $100\mu\text{A}$  y por lo

tanto es una escala de densidad óptica. La sensibilidad del instrumento es tal que cubre 6 decenas de intensidad en rangos de escala completa. La precisión de las medidas es en las escalas de 100, 30 y  $10\mu\text{A}$  un error máximo de 0.1%, en las escalas de  $3\mu\text{A}$  a  $1\text{nA}$  el error máximo es de 0.2% y para  $300\text{pA}$  y  $100\text{pA}$  el máximo error es 1.1%. El ruido que se tuvo en las medidas fue de aproximadamente  $2\text{pW}$ .

## 2.7. EL ARREGLO EXPERIMENTAL Y SU CALIBRACION.

Para la medición de las densidades ópticas de las muestras de tejido humano y soluciones de sangre, se instaló un sistema espectrofotométrico de alta resolución (Fig.4), que consiste de varias fuentes de radiación como son los láseres de argón (Control Laser modelo 553 y Coherent Innova 90 modelo 1186) y de colorante (599 Dye Laser, Rodamina 6G), una lámpara de halógeno-tungsteno, un monocromador marca ACTON modelo AM-505, fibras ópticas de cuarzo y vidrio, fotomultiplicador RCA-1P21, fotómetro RPH-17 y detector multicanal de arreglo de fotodiodos de alta sensibilidad, OMA-IRY-700S/RB, el cual cuenta con una computadora tipo PC para almacenar la información. El método de análisis es directo ya que únicamente es necesario introducir la solución de interés al instrumento para que se muestre el espectro resultante en el monitor en tiempo real.

La radiación de los láseres fue conducida hasta un acoplador láser-fibra óptica. Este acoplador fue diseñado y construido en el Laboratorio de Optica Aplicada del Centro de Instrumentos [Treviño, C., 1990]. La función del acoplador es enfocar la radiación de los láseres a la entrada de una fibra óptica y transmitirla hasta la muestra de interés.

La transmisión y colección de la radiación se hizo utilizando fibras ópticas de cuarzo de 400 y  $600\mu\text{m}$  de diámetro del corazón (core) y "atados" de fibras ópticas de vidrio con diámetros de 2 y  $7\text{mm}$ . La radiación proveniente de las fibras fue colocada a la entrada de un monocromador, así la luz es descompuesta en sus longitudes de onda características y enfocada en el plano de detección.

### 2.7.1. LA CALIBRACION DEL ARREGLO EXPERIMENTAL.

Para la medición de la luz transmitida y reflejada por cada muestra biológica se contó con un fotomultiplicador y un analizador multicanal óptico.

#### DEL FOTOMULTIPLICADOR.

La calibración del fotomultiplicador consistió en la medición de la irradiancia incidente sobre el fotocátodo con un voltaje de polarización fijo. La irradiancia permitió calcular los flujos de las longitudes de onda características de los láseres usados.

Para determinar la respuesta del fotomultiplicador a la señal de luz que recibe, se midieron los flujos incidentes en el fotocátodo del fotomultiplicador RCA-1P21, para diferentes voltajes de polarización eléctrica en el intervalo de operación (600-900V), colocado en la rendija de salida del monocromador. Se cambió la potencia de la radiación de los láseres de argón (2-3W) y de colorante (0.1-1W) y se midieron las densidades de flujo para las líneas del láser de argón y algunas líneas del láser de colorante. Se realizaron las mismas medidas con un detector de silicio, que cuenta con un medidor de potencia marca Newport, modelo 835 calibrado por el fabricante, con la respuesta espectral compensada. La corriente eléctrica de salida del fotomultiplicador es convertida a flujo radiante con la ecuación siguiente (ver Apéndice B):

$$\Phi = \frac{I_c}{\rho G} \quad (8)$$

donde  $I_c$  es la corriente del fotocátodo,  $\rho$  la responsividad y  $G$  es la ganancia del fotomultiplicador.

Se compararon los flujos medidos por el fotomultiplicador con los del detector de silicio para diferentes longitudes de onda y voltajes de polarización eléctrica. Se graficaron los flujos del fotomultiplicador,  $\Phi$ (FM), contra los flujos del fotodiodo de silicio,

Φ(FD) para cada longitud de onda. Las Gráficas 5a y 5b muestran la relación encontrada entre las medidas para las líneas espectrales de 514.5 y 496.5nm del láser de argón, respectivamente. Los datos graficados se muestran en las Tablas Ia y Ib. La relación encontrada en cada caso fue lineal; la variación de la pendiente en cada gráfica se debe al aumento del voltaje de polarización lo cual aumenta la ganancia del fotomultiplicador.

La calibración del monocromador se hizo de manera simultánea a la del fotomultiplicador, ésta se logró fijando una línea espectral bien conocida de una lámpara de mercurio y se giró la rejilla de difracción hasta obtener la señal en el detector. Después se colocó en ceros el dial del monocromador hasta obtener el valor de la longitud de onda del haz incidente. En este caso se debe considerar que la lectura del dial esta diseñada para una rejilla de 12001/mm, si se usa otra rejilla; por ejemplo, la de 1501/mm, se multiplica la lectura del dial por 8 para obtener la longitud de onda real del haz incidente en el detector.

El fotomultiplicador es un detector que mide la intensidad de luz incidente en un solo ancho espectral dado por el ancho de la rendija de salida del monocromador. Para obtener las medidas espectroscópicas en un intervalo espectral más grande en tiempo real, se usó el analizador multicanal óptico.

#### DEL ANALIZADOR MULTICANAL OPTICO.

La calibración del analizador multicanal óptico (OMA) fue de la siguiente manera: se colocó una lámpara de Hg a la entrada del monocromador y se giró la rejilla hasta obtener al menos dos líneas de emisión de la lámpara conocidas, estas líneas se pueden observar en un monitor. Se tomaron los números de los diodos en los cuales se encontraron ubicadas cada una de las líneas y por extrapolación se obtuvo la calibración de la longitud de onda asociada cada uno de los diodos. El enfoque del monocromador exactamente en la ventana de los fotodiodos es fundamental para obtener una buena resolución.

Se hicieron las calibraciones para las mismas rejillas de 150 y 1200ℓ/mm se pudo verificar que de 1024 diodos del arreglo sólo 710 son activos y se obtuvo una resolución de 3Å/diodo y de 0.38Å/diodo, respectivamente. De esta forma podemos obtener un intervalo espectral aproximado 215nm con la rejilla de 150ℓ/mm y de 27nm con la de 1200ℓ/mm, con estas especificaciones se procedió a trabajar con la rejilla de 150ℓ/mm para obtener el mayor intervalo espectral posible; el intervalo espectral en el que se trabajó fue de 380-595nm.

## CAPITULO 3

### EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y LOS RESULTADOS

#### 3.1. INTRODUCCION.

En este Capitulo se describe la medición de las densidades ópticas. Se muestran los resultados experimentales y se hace una comparación de éstos con los reportados en la literatura.

El procedimiento experimental puede dividirse en tres partes: a) la medición de la densidad óptica de tejidos de órganos humanos con el fotomultiplicador, b) la medición de la densidad óptica y densidad óptica aparente de tejidos de órganos humanos con el analizador multicanal óptico y c) la medición de la densidad óptica en soluciones de sangre.

Lo interesante del arreglo óptico experimental usado en las mediciones, es el uso de diferentes fuentes para radiar las muestras; el sistema cuenta con lámparas de halógeno-tungsteno y con láseres de radiación continua. Además, la luz es transmitida y colectada por medio de fibras ópticas al monocromador.

Las mediciones de las densidades ópticas características de cada muestra, fueron hechas mediante técnicas espectrofotométricas basadas en las medidas de transmisión y reflexión de la luz incidente.

Las primeras medidas de transmitancia y absorbancia de tejidos humanos de hígado, lengua y bazo se hicieron con el fotomultiplicador y después se tomaron espectros con el analizador óptico multicanal (OMA) con las mismas condiciones experimentales de los tejidos mencionados, además del riñón. La selección de los tejidos para ser irradiados fueron aquellos cuya estructura fuera lo más homogénea posible y que no presentaran destrucción mecánica al ser cortados por el micrótopo de congelación.

### 3.2. LA DENSIDAD OPTICA EN TEJIDOS HUMANOS IN-VITRO.

#### 3.2.1. LA PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE LOS TEJIDOS.

El Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Cardiología del CMN, Siglo XXI del IMSS, proporcionó las muestras de tejido fresco (hígado, lengua, riñón y bazo), obtenidos para estudios que ahí se practican y en colaboración con el Laboratorio Clínico del mismo Hospital se obtuvieron las muestras de sangre de los pacientes que diariamente son atendidos.

La preparación por parte de los médicos de las muestras de tejidos humanos in-vitro se hizo de la siguiente manera: al realizarse una autopsia, se hace la disección de los órganos de interés y los cortes precisos de los tejidos requeridos. Esto es, se cortó un fragmento, de aproximadamente 1.5x1x0.8cm, de hígado, lengua, riñón y bazo. Cada fragmento fue colocado en una platina especial, utilizando "tissueteck" para lograr una buena fijación y congelación del tejido; posteriormente se colocó en el micrótopo de congelación (American Optical) a -20°C para hacer cortes finos, tratando de evitar al máximo los artificios por desgarró o plegamiento. Los cortes fueron hechos a 9,18,27,36,45 y algunas hasta 72µm, ya que cuando los cortes son muy gruesos se dificulta su manejo y aumentan los artificios. En ocasiones fue necesario repetir algunos cortes para promediar las medidas y así obtener valores más precisos.

Cada una de los cortes de los tejidos fueron colocados en un portaobjetos de vidrio (fabricado por Intrademic, S.A., 25X75mm y 0.90 a 1.1mm de espesor), se les agregó solución salina al 9% y se colocaron cubreobjetos de 24x24mm, los cuales se sellaron para ayudar a la preservación del tejido. Las múltiples reflexiones disminuyen en las interfaces de vidrio-tejido (Fig.1) con la solución salina, debido al acoplamiento óptico que existe en la interface del vidrio-solución salina (agua), dados los valores entre el índice de refracción del vidrio (1.53) y el agua (1.33).

Es muy importante mantener las muestras frescas y evitar su resequeidad, debido a que en 50% de pérdidas de agua, el coeficiente de absorción se incrementa de un 20-50%, en el intervalo espectral del visible [Çilesiz, I.F. et al, 1993]. Además, la congelación del tejido puede alterar drásticamente sus propiedades ópticas [Maitland, J.T. et al, 1993].

Por los motivos expuestos anteriormente, todas las muestras fueron preparadas en el menor tiempo posible. El tiempo entre la obtención de las muestras de tejido y la irradiación de éstas fue en promedio de  $5 \pm 4$  horas, y de  $3 \pm 2$  horas para la sangre.

El tejido utilizado fue de pacientes que tenían menos de 24 horas de haber fallecido. Todas las muestras de cadáver se prepararon por especialistas en Anatomía patológica del Hospital de Cardiología.

Los trabajos reportados en la literatura indican que las muestras así preparadas permanecen con sus propiedades ópticas inalteradas por lo menos 24 horas [Marchesini, R. et al, 1989].

### 3.2.2. LA MEDICION DE LA DENSIDAD OPTICA EN TEJIDOS.

Con el fotomultiplicador.

Para la medición de la densidad óptica de tejidos humanos con el fotomultiplicador, primero, se calibró y optimizó ópticamente el sistema espectrofotométrico. Después, se fijó una longitud de onda sobre el plano de detección, y posteriormente se midió la transmitancia de la luz en muestras de  $9-45 \mu\text{m}$  de espesor de hígado, músculo y bazo. Estas muestras fueron irradiadas con las principales líneas espectrales del láser de argón: 476.5, 488.0, 496.5 y  $514.5 \text{nm}$  y del láser de colorante (dye R6G): 572.8, 578.2, 588.7, 599.3, 609.8 y  $620.0 \text{nm}$ . Fue necesario introducir al sistema la solución salina para medir la luz transmitida  $I_0$  (irradiancia inicial) y después ir introduciendo cada una de las muestras y medir la luz que deja pasar la muestra  $I$  (luz transmitida). Con estos datos se obtuvo la



transmitancia (Ec.3) y la densidad óptica (Ec.4). Las mediciones de la densidad óptica obtenidos para cada espesor de los diferentes tejidos se muestran en las Tablas IIa-IIc; éstos resultados muestran mayor densidad óptica de los tejidos a las longitudes de onda del láser de argón (ver Gráfica 6a-c). Estas Gráficas fueron obtenidas con los valores discretos de las longitudes de onda de los láseres, por tal razón no se muestra un espectro continuo, en particular, entre 520-570nm (longitudes de onda que no son emitidas por los láseres). Estas Gráficas muestran mayor densidad óptica de los tejidos para longitudes de onda cortas (longitudes de onda del láser de argón). Se puede apreciar cómo a mayor espesor del tejido mayor densidad óptica lo cual se debe al aumento de opacidad que se tiene al aumentar el espesor de los tejidos.

La relación entre la densidad óptica de cada muestra en función del espesor fue lineal (ver Gráficas 7,8,9), se obtuvo en la mayoría de estas rectas un coeficiente de regresión estándar de aproximadamente 0.9. Las Gráficas en general, muestran una absorbancia mayor para el hígado y menor para el bazo.

En las Gráficas 7a-c, se muestran los valores obtenidos para hígado en dos diferentes sujetos, para las longitudes de onda de 488, 514.5 y 620nm, respectivamente. También, se observa como el valor de la densidad óptica para el espesor de 18 $\mu$ m se desvía de la recta seguida por los otros espesores, esto se debe a posibles errores experimentales en la preparación de la muestra. Los resultados obtenidos para el músculo de lengua (Gráficas 8a y 8b) y bazo (Gráficas 9a y 9b), muestran una relación consistente de las medidas de la densidad óptica con los diferentes espesores.

Se obtuvieron los valores de los coeficientes de absorción total de los tejidos anteriores para las diferentes longitudes de onda. Para ésto, fue necesario calcular el valor de la pendiente de las rectas de las Gráficas 7-9, ya que la pendiente es directamente proporcional al coeficiente de absorción total de acuerdo a la Ec.5. Los valores obtenidos para el hígado fueron un promedio de los datos de los dos sujetos, mientras que en el caso del músculo de lengua y del bazo, fueron valores obtenidos para una solo sujeto (ver Tablas IIIa-c). Se

añadieron a estas Tablas los pocos valores teóricos reportados en la literatura [Cheong, W. et al, 1990]. Se puede ver en la Tabla IIIa que para el tejido de hígado humano irradiado con una longitud de onda de  $514.5nm$ , el coeficiente de absorción total experimental fue de  $294.0 \pm 28.2 cm^{-1}$  y el reportado en la literatura de  $304 \pm 21 cm^{-1}$  obteniendo una diferencia de aproximadamente el 3.5%, dentro de la incertidumbre estimada. Para el músculo de lengua y bazo prácticamente no se encontraron datos reportados en la literatura. En la Tabla IIIb se puede ver que para el músculo de lengua humana irradiado con la longitud de onda de  $514.5nm$ , el coeficiente de absorción total encontrado experimentalmente fue de  $135.4 cm^{-1}$  y el reportado en la literatura para músculo humano fue de  $541 \pm 45 cm^{-1}$ . La diferencia entre estos valores puede deberse principalmente a que el valor reportado en la literatura no especifica qué tipo de músculo humano fue irradiado, así es que estos valores no tienen porqué ser similares.

Con el propósito de simultáneamente medir las intensidades de varias longitudes de onda de luz a través de las muestras, fue útil instalar al sistema el analizador multicanal óptico (OMA), de esta forma se tiene una ventana espectral de aproximadamente  $215nm$  con todas las longitudes de onda bien definidas. Hay que tomar en cuenta que, con este detector disminuye la sensibilidad en un orden de magnitud, en comparación al fotomultiplicador RCA-1P21.

Con el analizador multicanal óptico.

Se instaló el Analizador Multicanal Óptico en la rendija de salida del monocromador y se repitió el mismo procedimiento experimental hecho con el fotomultiplicador. En ésta ocasión se irradiaron los tejidos con la lámpara de halógeno-tungsteno, con el propósito de medir las densidades ópticas en un intervalo espectral de longitudes de onda más largas. El intervalo espectral que se consideró fue de  $380-595nm$ .

Con este detector, se efectuaron las mediciones de la luz transmitida y reflejada por los tejidos humanos, para obtener la densidad óptica y la densidad óptica aparente.

Para medir la transmitancia de la muestra se colocó ésta antes de la rendija de entrada del monocromador. Cuando se irradió con los láseres la luz fue transmitida por medio de una fibra óptica de cuarzo de 600 $\mu$ m y cuando se irradió con la lámpara de halógeno-tungsteno fue con un atado (1.5 y 7mm) de fibras ópticas de vidrio.

El sistema espectrofotométrico es muy versátil para medir las propiedades antes mencionadas con diferentes fuentes de radiación. Es decir, se puede radiar las muestras con el continuo espectral de la lámpara de halógeno, con todas las longitudes de onda características del láser de argón y del láser de colorante al mismo tiempo. El método de análisis es directo, ya que únicamente es necesario introducir la muestra de interés, ya sea la muestra de tejido humano o la solución de sangre disuelta en agua destilada, para que se muestre inmediatamente en el monitor de la computadora auxiliar, la transmisión o la reflexión de los tejidos respecto a las diferentes longitudes de onda de la luz incidente. Con la luz transmitida se obtuvo la densidad óptica (Ec.4) y con la luz reflejada la densidad óptica aparente (Ec.7) para cada muestra.

La medición de los espectros de transmitancia y de reflectancia, así como de sus respectivas densidades ópticas contra longitud de onda, se pudo hacer por medio del software con el que cuenta el programa OSMA.

Como las muestras son de diferentes cadáveres entonces hay una gran probabilidad de que los tejidos presenten diferentes características, aún tratándose del mismo tipo de tejido. Por estas razones, las medidas de las propiedades ópticas pueden diferir. Para tratar de obtener un promedio de los datos experimentales medidos, se repitieron las experiencias para tres muestras del mismo tejido de distintos cadáveres.

Los espectros de absorbancia obtenidos para los tejidos de hígado, lengua, riñón y bazo en sus distintos espesores se muestran en las gráficas 10a-10d, respectivamente. Estos espectros a diferencia de los obtenidos con los láseres muestran un continuo en el intervalo espectral del visible. Se puede apreciar de las Gráficas que cada tipo

de tejido tiene su espectro de absorbanza característico. El espectro del hígado (Gráfica 10a) es un espectro prácticamente constante con respecto a la longitud de onda para espesores de  $9\mu m$ , sin embargo al aumentar el espesor del tejido aumenta la densidad óptica entre el  $460-500nm$ . Los resultados para el músculo de lengua y el riñón son muy parecidos en el amarillo y el rojo, sin embargo en el azul, apesar de que ambos tienen un pico de absorción alrededor del  $440nm$ , en el riñón este pico es más pronunciado (ver Gráficas 10b y 10c). El espectro obtenido para el bazo (Gráfica 10d) muestra tres picos de absorción característicos de la hemoglobina ; ésto se debe a que el bazo contiene una gran cantidad de sangre. Otra característica que muestra ésta Gráfica es que cuando el espesor aumenta los picos de absorción se hacen más pronunciados y más angostos. Esto sobresale más en el pico de absorción en la longitud de onda del azul, alrededor del  $430nm$ ; en este pico existe un corrimiento en longitud de onda hacia el rojo conforme aumenta el espesor, comportamiento similar al encontrado al aumentar la concentración de sangre en el agua destilada.

En la Gráfica 11a se puede ver la dependencia lineal entre la densidad óptica y el espesor del tejido de hígado en las longitudes de onda de  $463.9$ ,  $488.2$ ,  $514.6$  y  $540.0nm$ , tal como lo predice la Ley de Beer. Para las longitudes de onda de  $420$  y  $435.7nm$  esta relación no es lineal. Esto se debe a que en estas longitudes de onda se encuentran los picos de absorción característicos de la hemoglobina. En las Gráficas 11b-11d, se muestra la misma relación anterior solo que para los tejidos de músculo de lengua, riñón y bazo.

Cabe mencionar en esta parte, que la dependencia entre la densidad óptica y los espesores de los tejidos depende en gran medida de la longitud de onda de la radiación.

Se observa el alto contenido de la sangre en el tejido humano, por ejemplo, en el bazo, debido a que algunos picos de absorbanza de algunos tejidos coinciden con los obtenidos en la hemoglobina (ver Gráfica 13, la cual se discutirá más adelante).

### 3.2.3. LA MEDICION DE LA DENSIDAD OPTICA APARENTE EN TEJIDOS HUMANOS.

Con el analizador multicanal óptico.

La luz fue transmitida por un atado de fibras, para las medidas de reflectancia con la lámpara de halógeno-tungsteno, colocados a 45° de la muestra. De esta forma la luz es reflejada en su gran mayoría a 90° de la dirección de la luz incidente, por esta razón la luz reflejada fue capturada por otro manojo de fibras colocado a 90° de las fibras con que se irradió. Los extremos de las fibras quedaron colocados muy cerca de la muestra y de ellas para evitar que, a causa de la apertura numérica de las fibras ópticas los haces de luz incidente y reflejado divergieran mucho. Se consideraron las aperturas numéricas de las fibras ópticas de cuarzo y de vidrio, para conducir el máximo de luz de los láseres y de la lámpara.

Las medidas de la luz reflejada fueron para determinar la densidad óptica "aparente" de las muestras de tejido humano en función del espesor al ser irradiadas con la lámpara de halógeno (Gráficas 12a-d).

Se obtuvieron las densidades ópticas aparentes, D.O.A., del hígado, músculo de lengua, riñón y bazo. Estos espectros se muestran en las gráficas 12a-12d, al irradiarse las muestras con la lámpara de tungsteno. De manera general se puede observar la baja reflectancia de las longitudes de onda que fueron absorbidas fuertemente por el mismo tejido. Se observa mayor reflectancia de la luz en longitudes de onda más largas (540 y 570nm), lo contrario que se obtuvo para la transmitancia, donde la longitud de onda de 540nm fue menor. Estos resultados son importantes ya que se obtuvieron dos medidas ópticas: densidad óptica y densidad óptica aparente, y ambas se complementan, al menos cualitativamente.

Por otro lado, estos espectros de la medición de la densidad óptica aparente tienen mayor ruido que los de densidad óptica esto se debe al mayor esparcimiento de la luz y a que la razón de señal a ruido en la reflectancia es mucho menor que en el caso de la transmitancia, puesto que sólo se colecta la luz reflejada especularmente, perdiéndose la

luz reflejada de manera difusa por la muestra. Esta señal debe mejorar sustancialmente al colectar la luz reflejada con la ayuda de una esfera integradora.

### 3.3. LA DENSIDAD OPTICA EN LAS SOLUCIONES DE SANGRE.

#### 3.3.1. LA PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE SANGRE.

La preparación de las muestras de sangre fue de la siguiente manera: se colocaron 35ml de agua destilada en un recipiente, se le agregó 10 $\mu$ l de sangre venosa humana fresca y se mezcló hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente se colocó en una cubeta de cuarzo de caras paralelas (10X10X40mm). Como únicamente interesa el espectro de absorción de la hemoglobina, el resultado obtenido se le resta la luz transmitida por el agua destilada. La luz transmitida por la solución (I) entre la intensidad de luz transmitida por el agua destilada ( $I_0$ ) dá la transmitancia ( $I/I_0$ ) de la hemoglobina (componente principal de la sangre).

La razón por la cual se usó sangre diluida en agua destilada fue para poder obtener las medidas de los espectros de transmisión de la luz, debido a que la sangre humana transmite debilmente la luz y se dificulta su detección. Adicionalmente, disminuye considerablemente el esparcimiento de la luz.

#### 3.3.2. LA MEDICION DE LA DENSIDAD OPTICA EN SOLUCIONES DE SANGRE.

Las soluciones de sangre se colocaron en una cubeta de cuarzo con caras paralelas para ser irradiadas. Este tipo de cubeta evita desviaciones de la luz o diferencias de camino óptico de la luz, caso que se presenta en la superficie en tubos de ensayo de forma cilíndrica. Es recomendable no tocar las paredes de la cubeta para evitar adherirle grasa, polvo, alguna otra sustancia o rayarlas. La precisión en la medición de la luz transmitida depende criticamente de las paredes de la cubeta ya que cualquier depósito o rayado sobre ellas altera las medidas. Es necesario limpiar completamente la cubeta antes y después de usarla.

Las mediciones fueron hechas de la siguiente manera: se seleccionaron las longitudes de onda de los láseres en la ventana espectral del OMA, se introdujo la cubeta con agua destilada al sistema y se obtuvo el espectro de luz transmitida a través de ella ( $I_0$ ), posteriormente se vació el contenido de la cubeta y se le agregó una de las muestras de solución de sangre, se irradió y se obtuvo su espectro de transmisión ( $I$ ). Después, se cambió de solución y se repitió el mismo procedimiento.

Las medidas de la luz transmitida se hicieron para las siguientes proporciones: 35ml de agua destilada y 10 $\mu$ l de sangre. Posteriormente se tomaron medidas de las soluciones con 10-80 $\mu$ l de sangre en 35ml de agua destilada, para una misma muestra de sangre.

Con estos datos se obtuvo la transmitancia debida a la hemoglobina y posteriormente se obtuvo la densidad óptica en función de la longitud de onda (ver Gráfica 13). Se pueden apreciar los picos de absorbancia en 410, 540 y 577nm. Estos son picos característicos en el espectro visible de la hemoglobina, el principal componente de la sangre. La densidad óptica de sangre resultó mayor en el intervalo del visible para longitudes de onda más cortas con irradiación de la lámpara de tungsteno. En esta Gráfica también se muestra el espectro de absorción para diferentes cantidades de sangre (10-80 $\mu$ l) disueltas en la misma cantidad de agua destilada (35ml). Lo interesante de esto, es ver cómo a mayor cantidad de sangre hay más densidad óptica, además se puede apreciar cómo el pico de absorción (banda de Soret) en la longitud de onda de 410nm tiene un corrimiento hacia el rojo (430nm), debido al espaciamiento de luz, al aumentar la concentración. Este mismo comportamiento se puede ver para el espectro de absorción del bazo (Gráfica 10d). Este comportamiento se debe al fenómeno de espaciamiento que presenta la muestra.

Es importante mencionar, que los espectros de absorción de la sangre con los picos característicos de la hemoglobina, son similares a los reportados en la literatura [Wilson, B.C. et al, 1990].

La variación de la densidad óptica en función de la concentración de hemoglobina en la sangre venosa desoxigenada humana, se muestra en la Gráfica 14, en donde la variación de la concentración de hemoglobina es desde 11.5g/100ml a 16g/100ml, aproximadamente. Cada una de las muestras de sangre de 10 $\mu$ l se mezclaron con 35ml de agua destilada. Las medidas de la densidad óptica que se obtuvieron con estas muestras se pueden ver en la Gráfica 14 para las longitudes de onda de 420.0, 430.0, 440.1, 540.2 y 560.0nm. Las pendientes de las curvas cambian hasta obtener una pendiente igual a cero, este comportamiento es típico de un fenómeno de saturación de la muestra. La concentración de la hemoglobina se modifica por diversos padecimientos, por lo que es muy importante para el médico conocer esta cifra para el mejor estudio de su paciente.

Cabe mencionar que la concentración de hemoglobina en la sangre depende de la edad, sexo y estado de salud del paciente. Esta información es útil a los médicos para hacer el diagnóstico integral del paciente.



## CONCLUSIONES

Con el arreglo óptico espectrofotométrico propuesto en esta Tesis, se realizaron varias mediciones de las densidades ópticas en los tejidos humanos de hígado, músculo de lengua, riñón y bazo, así como de las soluciones en agua destilada de diferentes concentraciones de hemoglobina en la sangre humana, mediante técnicas espectroscópicas. Todas las mediciones de transmitancia y reflectancia fueron hechas con muestras in-vitro.

Los resultados obtenidos de la densidad óptica y densidad óptica aparente, permitieron conocer algunas de las características de la sangre y los tejidos humanos irradiados, en relación a las diferentes longitudes de onda en el espectro visible.

El método propuesto para la medición de estas propiedades ópticas cumple con la Ley de Beer, puesto que se obtuvo una relación lineal entre las medidas de la densidad óptica y los diversos espesores de las muestras.

### LAS DENSIDADES OPTICAS DE TEJIDOS HUMANOS.

Para las mediciones de la densidad óptica de tejidos humanos, los resultados que se obtuvieron son muy importantes ya que muestran las ventajas de usar un láser de argón en el intervalo espectral del visible. En particular, para el tejido de hígado humano fue posible comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados en la literatura, en donde se obtuvo una diferencia del 3.5%, dentro de la incertidumbre estimada.

La técnica espectroscópica propuesta permite la medición de las densidades ópticas en la dirección de irradiación de las muestras en función de la longitud de onda en el intervalo espectral del visible

El procedimiento experimental que se siguió para obtener los espectros es relativamente sencillo, basta solamente introducir la muestra de interés al arreglo óptico experimental para obtener la intensidad de luz reflejada o transmitida.

Los resultados indican la validez de la Ley de Beer, al menos para espesores de tejido de 9 a  $45\mu\text{m}$ , debido a la relación lineal entre la densidad óptica y el espesor de cada tejido.

El sistema espectrofotométrico permite analizar las propiedades ópticas en muestras biológicas al ser irradiadas con fuentes de espectro continuo (lámpara de halógeno-tungsteno) o con fuentes de radiación láser.

Los valores de los coeficientes de absorción total reportados en la literatura son muy pocos, por lo que este trabajo contribuye al conocimiento de estos parámetros ópticos para posibles aplicaciones clínicas.

#### DENSIDADES OPTICAS APARENTES DE TEJIDOS HUMANOS.

La densidad óptica aparente es una medida de la cantidad de luz reflejada por la muestra, por ésta razón, estos espectros tienen la forma inversa a los encontrados para la densidad óptica, la cual es una medida de la luz transmitida por la muestra. Así que como era de esperarse, que las longitudes de onda de la radiación que fueron altamente transmitidas por cada tejido, se reflejaran en menor proporción. De tal forma, que las mediciones de la densidad óptica y de la densidad óptica aparente resultan ser complementarias en el análisis de las características de los tejidos humanos, para futuras aplicaciones de dosimetría.

Una de las mayores ventajas del sistema es la posibilidad de medir, tanto la luz reflejada como la luz transmitida por cada muestra para diversas fuentes de radiación en diferentes intervalos espectrales.

## DENSIDAD OPTICA EN SOLUCIONES DE SANGRE.

El espectro de absorción de la sangre muestra los picos característicos de la hemoglobina, en las longitudes de onda de 420, 540 y 577nm del espectro visible. Los espectros de absorbancia que se obtuvieron son similares a los reportados en la literatura.

Es posible suponer que los picos de absorción alrededor del 410 y 550nm de algunos tejidos como hígado, músculo de lengua, riñon y bazo humanos; corresponden a los picos de absorción (banda de Soret) de la hemoglobina.

Para las soluciones con mayor cantidad de sangre y para los tejidos de mayor espesor se pudo distinguir el corrimiento del pico de absorción localizado en el 420nm, aproximadamente. Esto se debe al fenómeno de esparcimiento que presentan las muestras a la radiación, en este intervalo espectral.

Con los resultados obtenidos, se puede decir, que la ley de Beer explica muy bien el proceso de absorción de la luz en medios donde la absorción domina el esparcimiento. Sin embargo, los tejidos biológicos son altamente dispersores por su estructura, y la ley de Beer no es completamente válida para muchos casos que son radiados con varias longitudes de onda.

Lo que se pretende con este trabajo es comenzar a analizar los fenómenos de la interacción luz-tejido biológico de manera cuantitativa, para futuras aplicaciones de dosimetría en el área de la Medicina. Y por supuesto, ver la posibilidad de hacer las mediciones *in-vivo*, ya que las propiedades ópticas de tejido biológico determinadas *in vitro*, difieren de los valores *in vivo* por encontrarse las muestras en diferentes condiciones experimentales.

Por lo anterior es útil saber qué partes de las medidas *in vitro* pueden ser usadas en el procedimiento de la investigación de las propiedades ópticas *in vivo*.

En trabajos futuros habrá que tener mayor cuidado en la consideración de los efectos de absorción y de esparcimiento, los cuales surgen de manera independiente. En este caso, para coleccionar la luz esparcida por el tejido o muestra, lo recomendable es usar una esfera integradora de luz para medir, tanto la luz transmitida como la reflejada en las tres componentes espaciales. El uso de este instrumento optoelectrónico permitirá analizar las medidas con una aproximación más exacta de los fenómenos que ocurren en la interacción de la luz con el tejido humano. Esto permitiría usar algún otro modelo de aproximación, como el Modelo de Difusión, que sea más cercano a la realidad para obtener un análisis más preciso de esta interacción.

Para obtener mejores resultados en las mediciones de las densidades ópticas de las soluciones de sangre, es necesario trabajar con menores concentraciones de hemoglobina en la sangre para evitar llegar a la saturación.

FIGURAS.

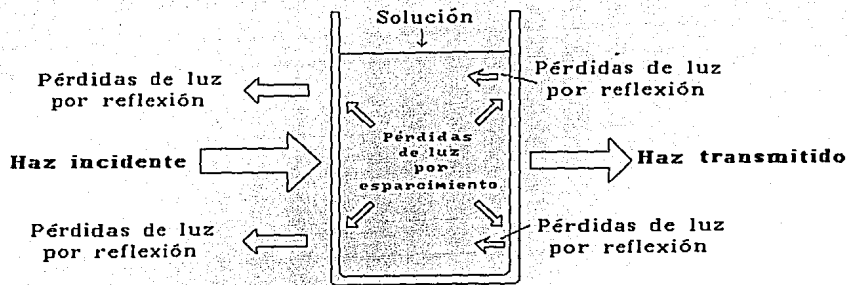


Fig.1 Pérdidas en la intensidad del haz incidente debidas a la absorción y reflexión al interactuar con la muestra.

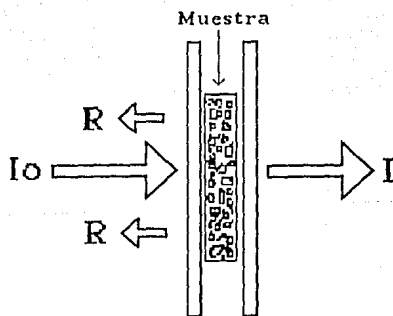


Fig.2 Interacción de la luz en tejido humano

# ENERGIA RELATIVA

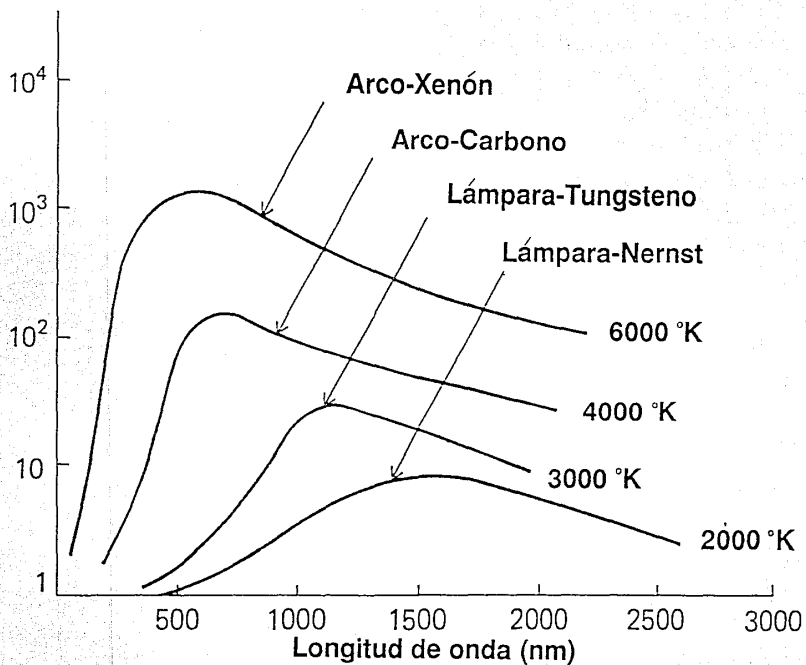


Fig. 3. Curvas de emisión de cuerpo negro para diferentes fuentes de radiación [Skoog, D.A., 1971].

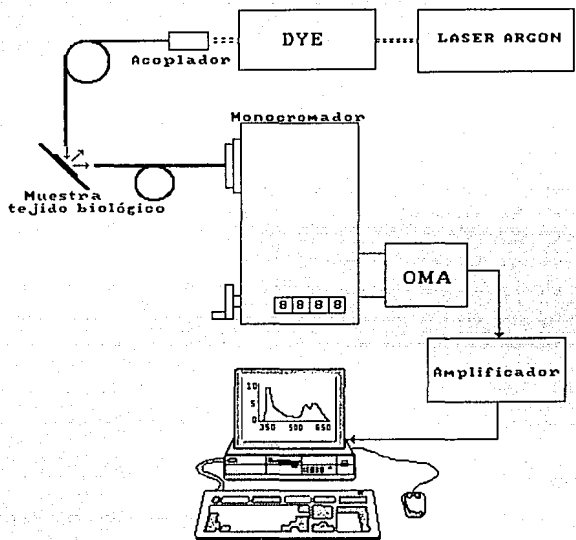


Figura 4. Sistema espectrofotométrico experimental.



TABLAS.

TABLA Ia. Respuesta del fotomultiplicador para diferentes voltajes de polarización eléctrica con una línea de emisión característica del láser de argón.

$\lambda = 514.5\text{nm}$							
		V= 600volts		V= 700volts		V= 800volts	
P (mW)	$\Phi$ (FD) (nW)	I (FM) ( $\mu\text{A}$ )	$\Phi$ (FM) (nW)	I (FM) ( $\mu\text{A}$ )	$\Phi$ (FM) (nW)	I (FM) ( $\mu\text{A}$ )	$\Phi$ (FM) (nW)
100	0.85	1.0	0.33	3.5	0.44	7.7	0.42
200	2.63	2.8	0.93	11.0	1.38	25.7	1.40
300	4.04	4.5	1.50	17.7	2.23	43.0	2.34
400	5.46	6.3	2.10	23.5	2.96	58.0	3.16
500	6.79	7.8	2.60	29.5	3.72	76.0	4.14
600	8.05	9.4	3.13	36.0	4.54	93.0	5.06
700	9.33	11.0	3.67	41.0	5.17	108.4	5.90
800	10.72	12.6	4.19	46.5	5.87	124.6	6.78
900	11.92	14.0	4.60	52.0	6.56	138.5	7.54
1000	13.19	15.5	5.16	57.0	7.19	---	---

TABLA Ib. Respuesta del fotomultiplicador para diferentes voltajes de polarización eléctrica con una línea de emisión característica del láser de argón.

$\lambda = 496.5\text{nm}$									
		V= 600volts		V= 700volts		V= 800volts		V= 900volts	
P (mW)	$\Phi$ (FD) (nW)	I (FM) ( $\mu\text{A}$ )	$\Phi$ (FM) (nW)	I (FM) ( $\mu\text{A}$ )	$\Phi$ (FM) (nW)	I (FM) ( $\mu\text{A}$ )	$\Phi$ (FM) (nW)	I (FM) ( $\mu\text{A}$ )	$\Phi$ (FM) (nW)
100	0.58	0.9	0.26	3.0	0.33	8.0	0.38	20	0.45
200	1.16	1.8	0.50	5.6	0.61	16.4	0.77	38	0.85
300	1.59	2.3	0.67	7.7	0.84	22.0	1.03	52	1.16
400	2.00	3.0	0.86	10.0	1.09	27.5	1.29	66	1.48
500	2.49	3.6	1.03	12.0	1.30	34.5	1.62	83	1.86
600	2.87	4.2	1.21	14.0	1.52	39.0	1.83	98	2.19
700	3.29	4.8	1.38	16.0	1.74	45.0	2.11	111.6	2.50
800	3.64	5.4	1.55	18.0	1.96	50.5	2.37	126.0	2.82
900	4.00	5.8	1.67	20.0	2.17	55.0	2.58	139.3	3.12
1000	4.33	6.4	1.84	21.5	2.34	62.0	2.91	---	---

TABLA IIa. Medidas de las densidades ópticas de los diferentes espesores de hígado humano con irradiación de luz láser de argón y de colorante.

$\lambda$ (nm)	D.O.(9 $\mu$ m)	D.O.(18 $\mu$ m)	D.O.(27 $\mu$ m)	D.O.(36 $\mu$ m)	D.O.(45 $\mu$ m)
476.5	1.17	0.23	0.43	0.54	0.69
488.0	1.17	0.25	0.37	0.55	0.67
496.5	0.18	0.22	0.38	0.56	0.73
514.5	0.17	0.24	0.37	0.54	0.65
572.8	0.15	0.13	0.19	0.23	0.49
578.2	0.15	0.13	0.22	0.31	0.51
588.7	0.14	0.13	0.18	0.30	0.48
599.3	0.14	0.15	0.19	0.34	0.46
609.8	0.13	0.11	0.19	0.29	0.46
620.0	0.12	0.16	0.26	0.39	0.47

TABLA IIb. Medidas de las densidades ópticas de los diferentes espesores de músculo de lengua humana con irradiación de luz láser de argón y de colorante.

$\lambda$ (nm)	D.O.(9 $\mu$ m)	D.O.(18 $\mu$ m)	D.O.(27 $\mu$ m)	D.O.(36 $\mu$ m)	D.O.(45 $\mu$ m)
476.5	0.18	0.23	0.30	0.35	0.38
488.0	0.15	0.26	0.29	0.35	0.38
496.5	0.15	0.26	0.27	0.32	0.35
514.5	0.14	0.19	0.27	0.30	0.35
572.8	0.16	0.23	0.26	0.29	0.32
578.2	0.16	0.21	0.25	0.28	0.32
588.7	0.14	0.21	0.23	0.25	0.32
599.3	0.15	0.21	0.23	0.27	0.30
609.8	0.12	0.18	0.21	0.24	0.28
620.0	0.12	0.18	0.20	0.21	0.24

TABLA IIc. Medidas de las densidades ópticas de los diferentes espesores de brazo humano con irradiación de luz láser de argón y de colorante.

$\lambda$ (nm)	D.O.(9 $\mu$ m)	D.O.(18 $\mu$ m)	D.O.(27 $\mu$ m)	D.O.(36 $\mu$ m)
476.5	0.08	0.16	0.26	0.31
488.0	0.07	0.16	0.27	0.29
496.5	0.09	0.15	0.27	0.30
514.5	0.08	0.13	0.27	0.28
572.8	0.05	0.10	0.20	0.22
578.2	0.09	0.11	0.18	0.20
588.7	0.05	0.08	0.16	0.16
599.3	0.05	0.10	0.17	0.20
609.8	0.04	0.07	0.17	0.18
620.0	0.04	0.08	0.15	0.18

TABLA IIIa. Comparación de los coeficientes de absorción total ( $\mu$ ) experimentales con irradiación de luz láser y los valores reportados en la literatura de hígado humano [Cheong, W. et al, 1990].

$\lambda$ (nm)	$\mu$ (1/cm) experimentales	$\mu$ (1/cm) reportados
476.5	371.8 $\mp$ 26.8	304 $\mp$ 21
488.0	330.0 $\mp$ 2.9	
496.5	332.2 $\mp$ 35.8	
514.5	294.0 $\mp$ 28.2	
572.8	222.3 $\mp$ 23.0	
578.2	232.6 $\mp$ 2.6	
588.7	222.3 $\mp$ 5.1	
599.3	221.1 $\mp$ 9.0	
609.8	224.9 $\mp$ 10.2	
620.0	232.5 $\mp$ 5.1	
635.0	-----	315 $\mp$ 137

TABLA IIIb. Comparación de los coeficientes de absorción total ( $\mu$ ) experimentales con irradiación de luz láser y los valores reportados en la literatura de músculo de lengua [Cheong, W. et al, 1990].

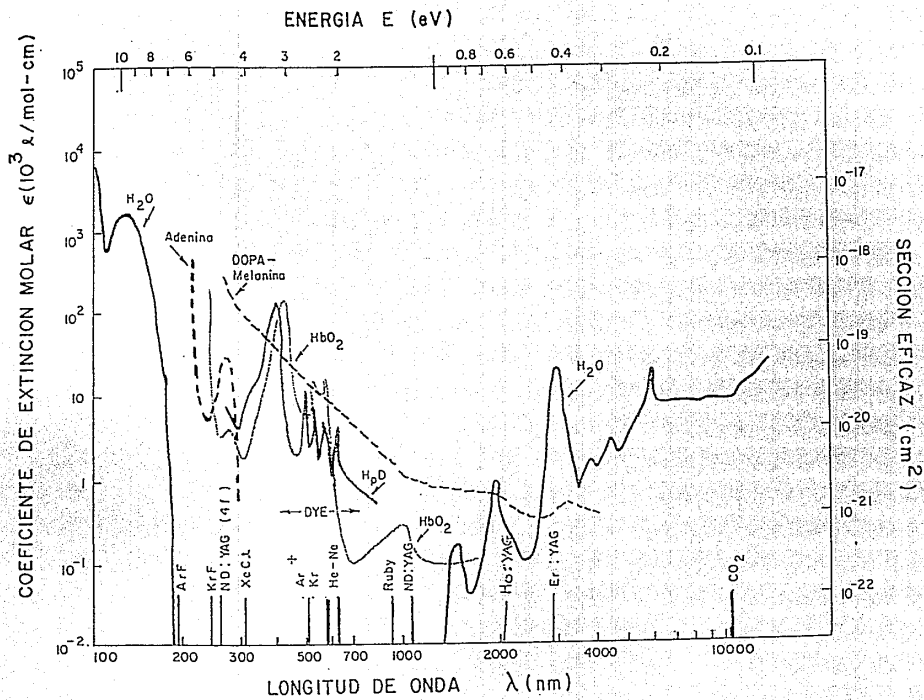
$\lambda$ (nm)	$\mu$ (1/cm) experimentales	$\mu$ (1/cm) reportados
476.5	132.9	541 $\mp$ 45*
488.0	140.6	
496.5	117.6	
514.5	135.4	
572.8	97.1	
578.2	99.7	
588.7	102.2	
599.3	92.0	
609.8	97.1	
620.0	69	

\*Músculo humano.

TABLA IIIc. Coeficientes de absorción total ( $\mu$ ) experimentales con irradiación de luz láser de bazo humano.

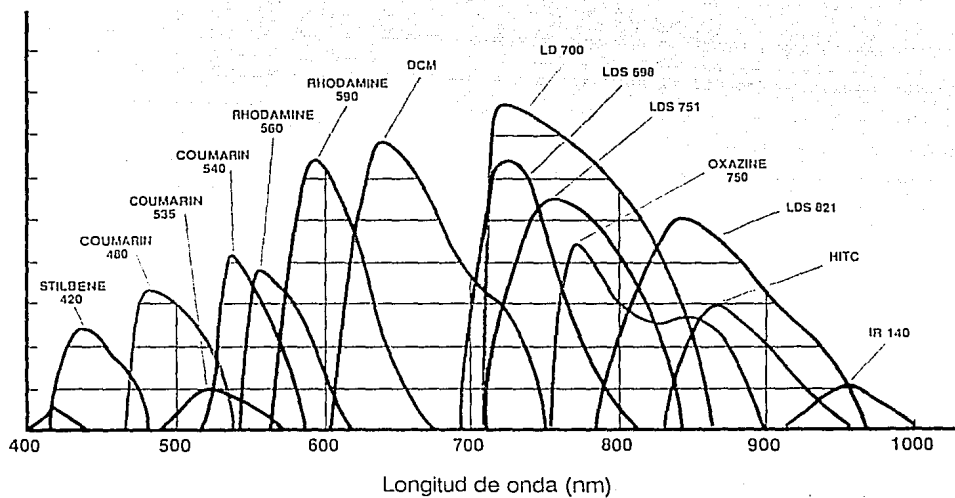
$\lambda$ (nm)	$\mu$ (1/cm) experimentales
476.5	201.9
488.0	196.8
496.5	191.7
514.5	189.1
572.8	155.9
578.2	102.2
588.7	104.8
599.3	132.9
609.8	132.9
620.0	125.2

GRAFICAS.

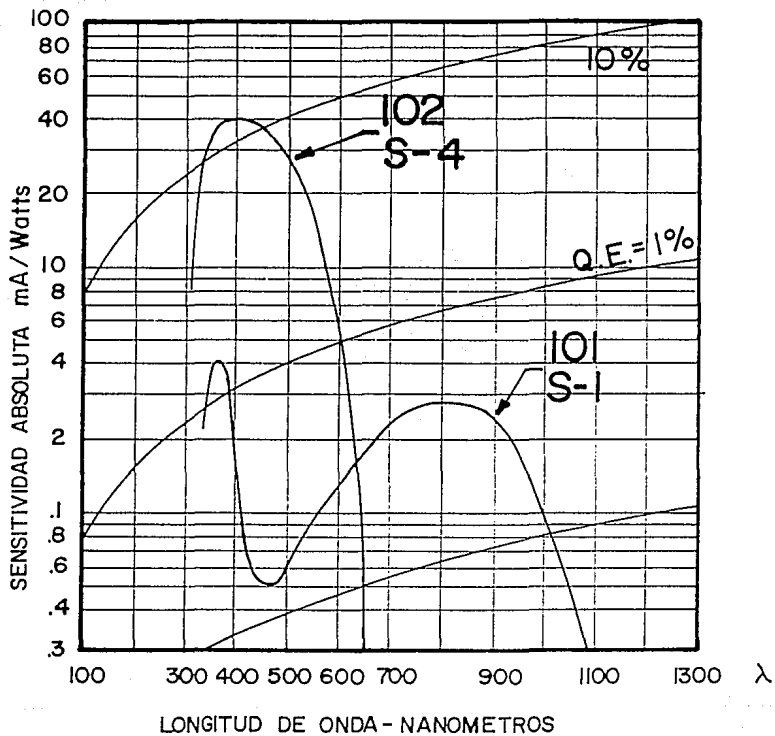


Gráfica 1. Propiedades de absorción de sustancias de interés médico.

Energía relativa



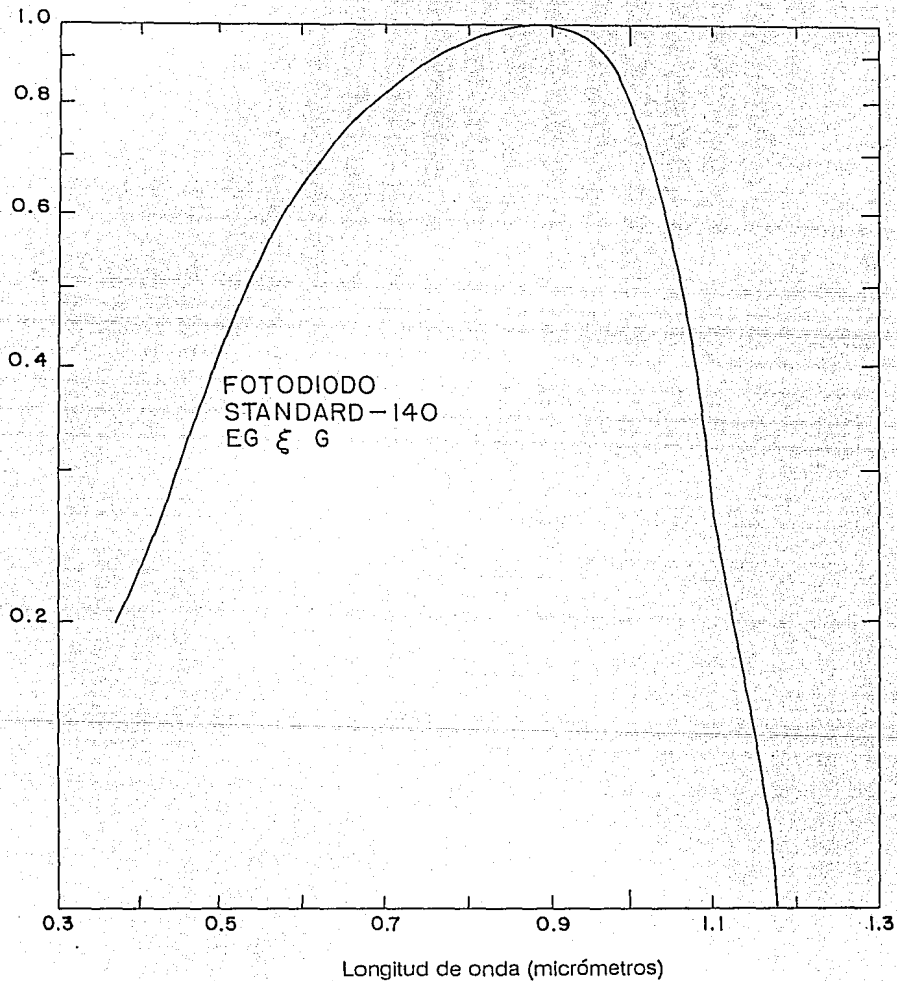
Gráfica 2. Espectro de fluorescencia de la rodamina 6G (Rhodamine 590)  
[Catálogo del Láser Dye, 1989].



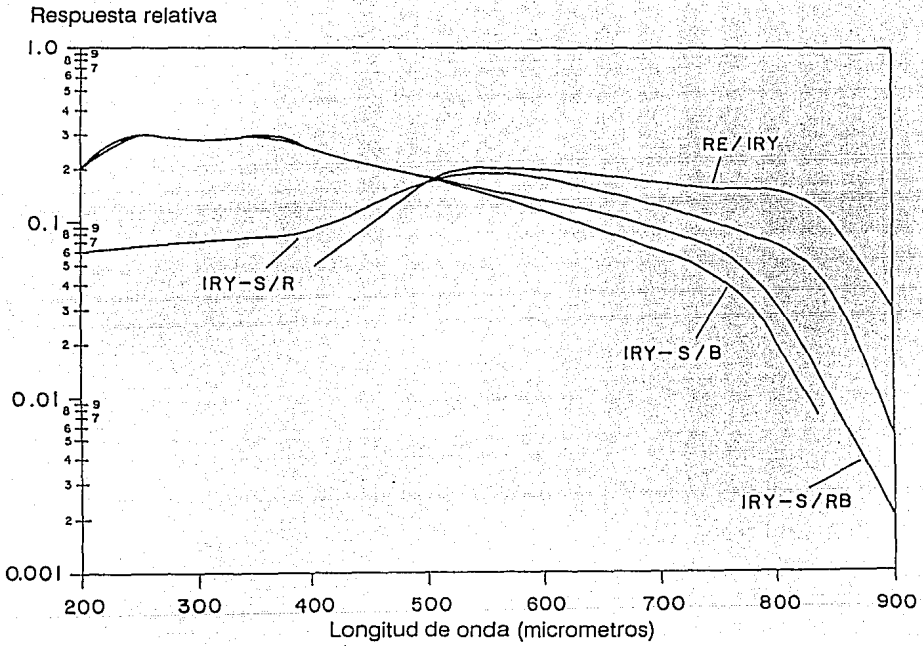
Gráfica 3a. Respuesta típica espectral del fotocátodo.



Respuesta relativa

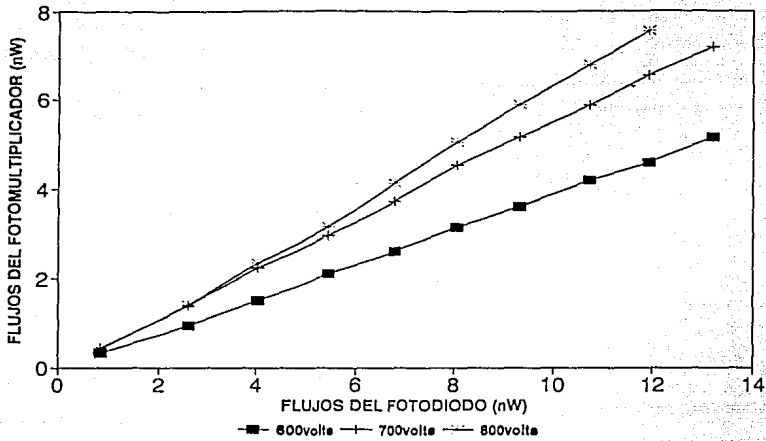


Gráfica 3b. Respuesta espectral del fotodiodo de silicio.



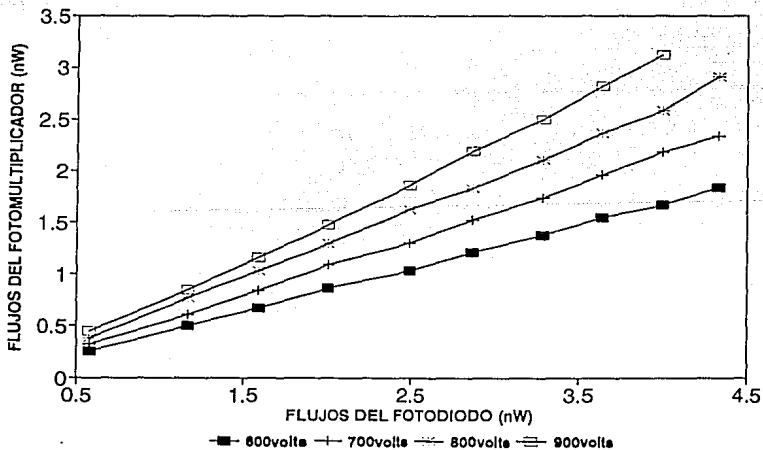
Gráfica 4. Respuesta típica espectral de los fotodiodos del arreglo lineal del OMA [Osma Manual].

### COMPARACION DE FLUJOS 514.5nm



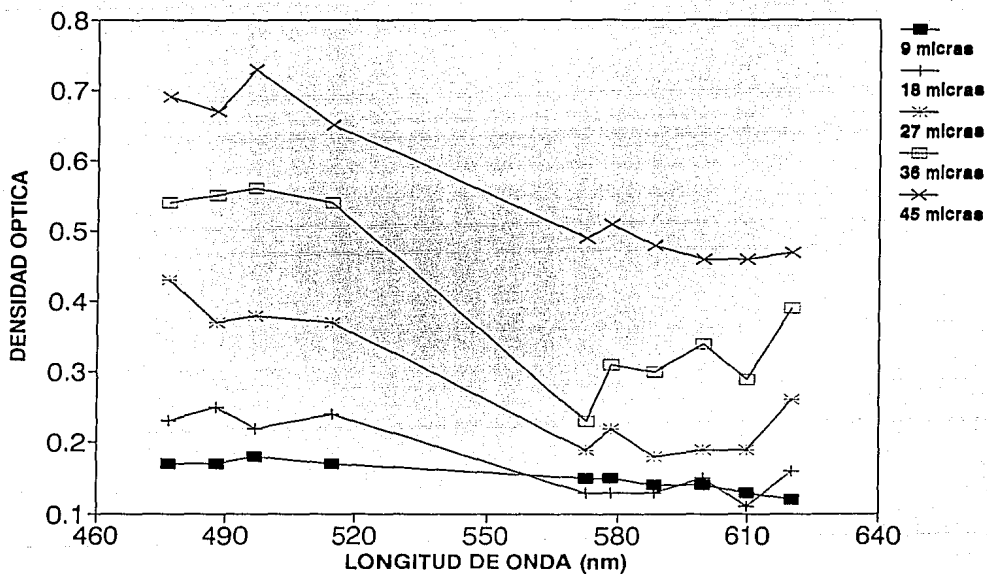
Gráfica 5a. Comparación de la respuesta del fotomultiplicador respecto a la del fotodiodo.

### COMPARACION DE FLUJOS 496.5nm



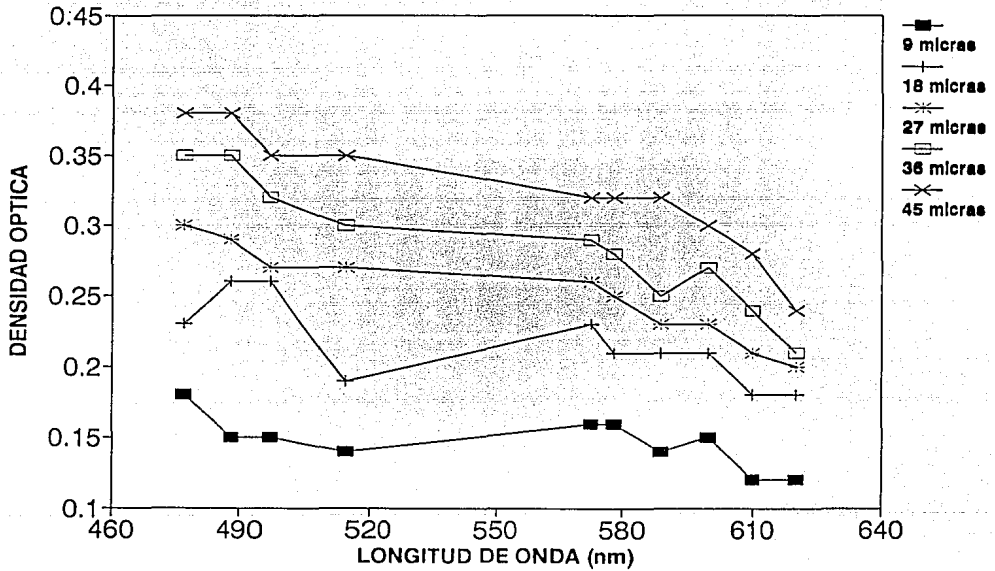
Gráfica 5b. Comparación de la respuesta del fotomultiplicador respecto a la del fotodiodo.

## ABSORBANCIA HIGADO



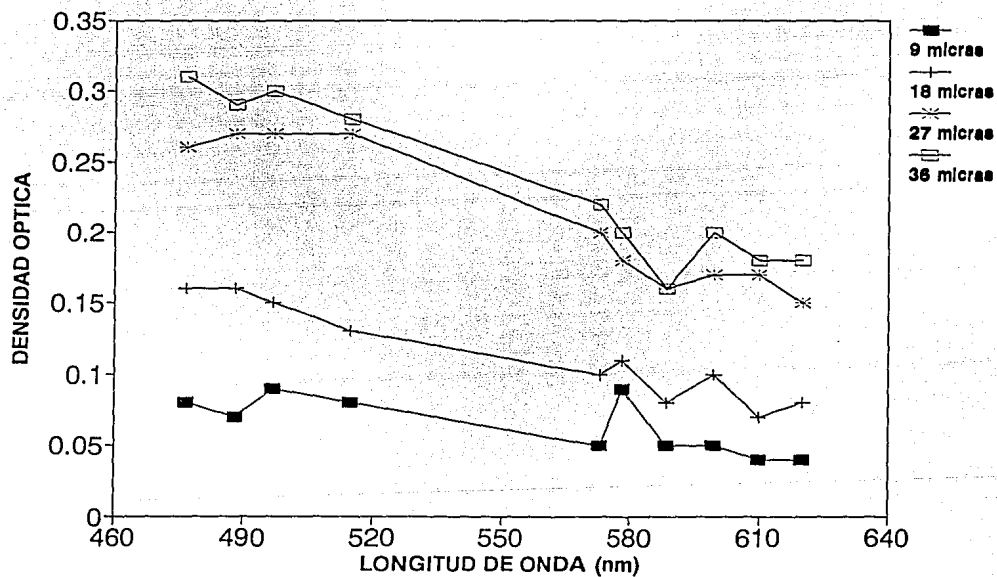
Gráfica 6a. Densidad óptica de diferentes espesores de tejido con irradiación de luz láser.

## ABSORBANCIA MUSCULO DE LENGUA



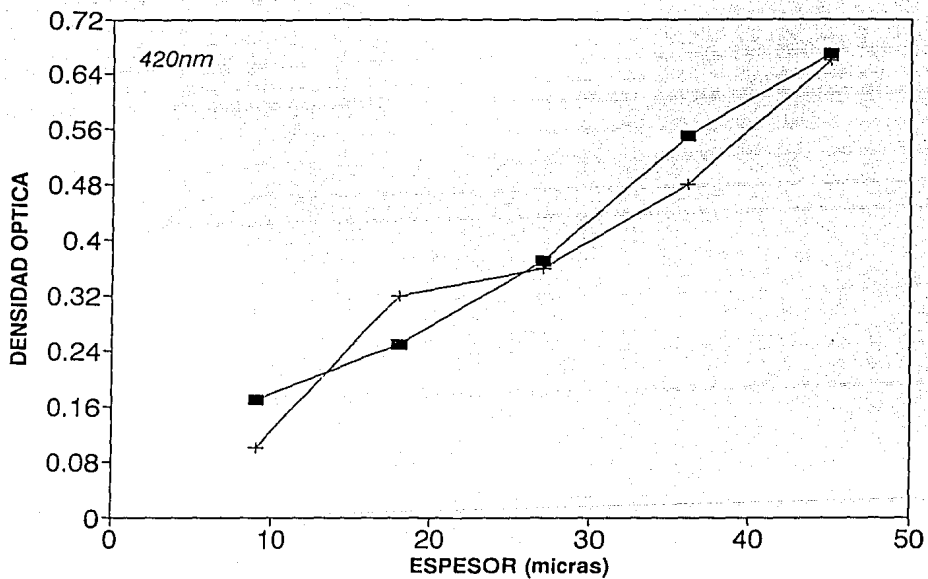
Gráfica 6b. Densidad óptica de diferentes espesores del tejido con irradiación de luz láser.

## ABSORBANCIA BAZO



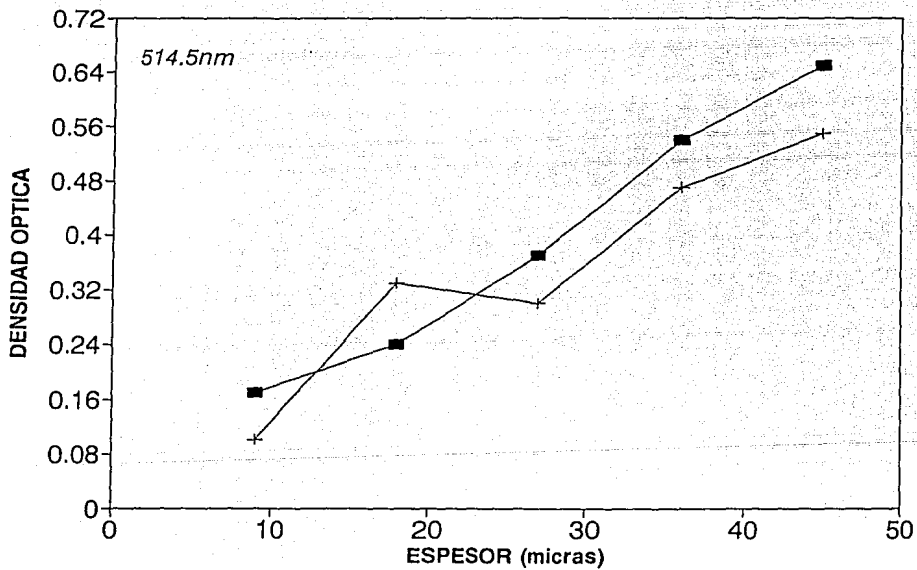
Gráfica 6c. Densidad óptica de diferentes espesores de tejido con irradiación de luz láser.

## ABSORBANCIA HIGADO



Gráfica 7a. Medidas de densidad óptica para diferentes sujetos con irradiación de luz láser de argón.

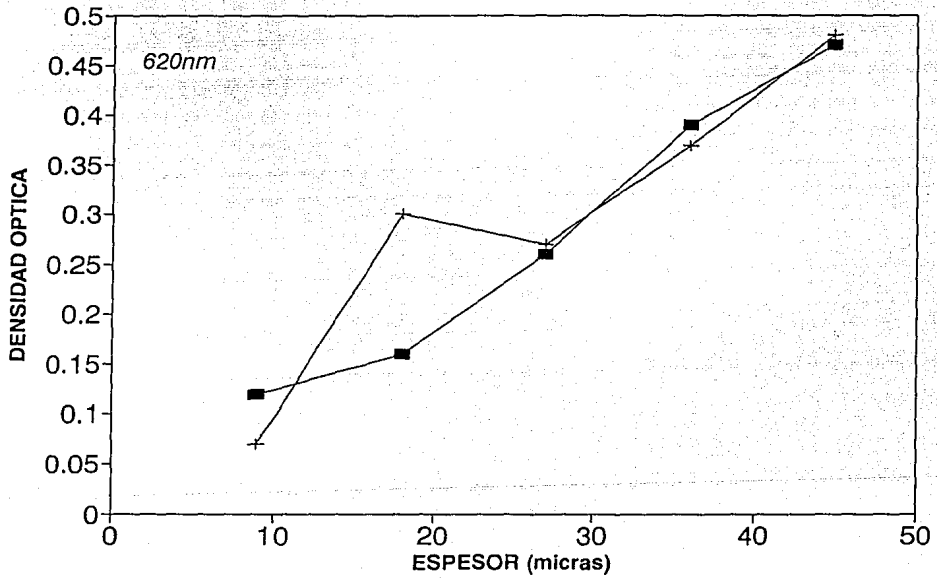
## ABSORBANCIA HIGADO



Gráfica 7b. Medidas de densidad óptica para diferentes sujetos con irradiación de luz láser de argón.

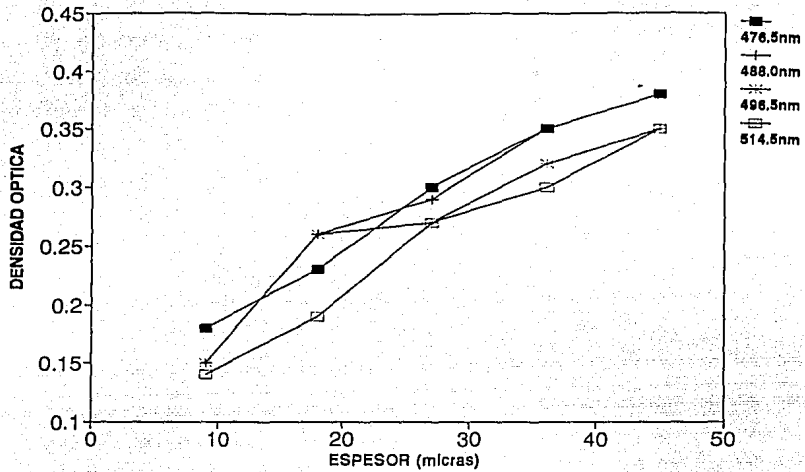


## ABSORBANCIA HIGADO



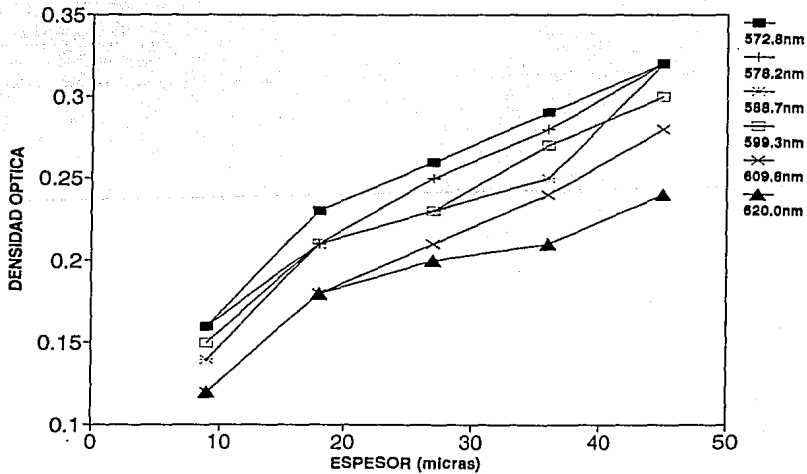
Gráfica 7c. Medidas de densidad óptica para diferentes sujetos con irradiación de luz láser de colorante.

### ABSORBANCIA MUSCULO DE LENGUA



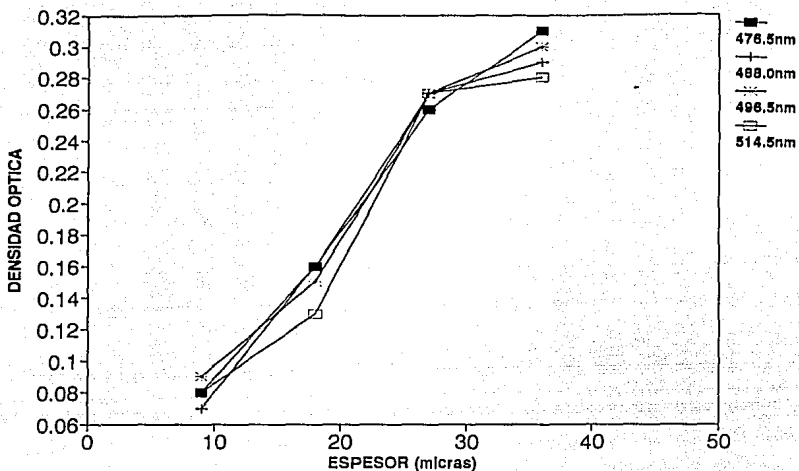
Gráfica 8a. Dependencia de la densidad óptica con el espesor del tejido con irradiación de luz láser de argón.

### ABSORBANCIA MUSCULO DE LENGUA



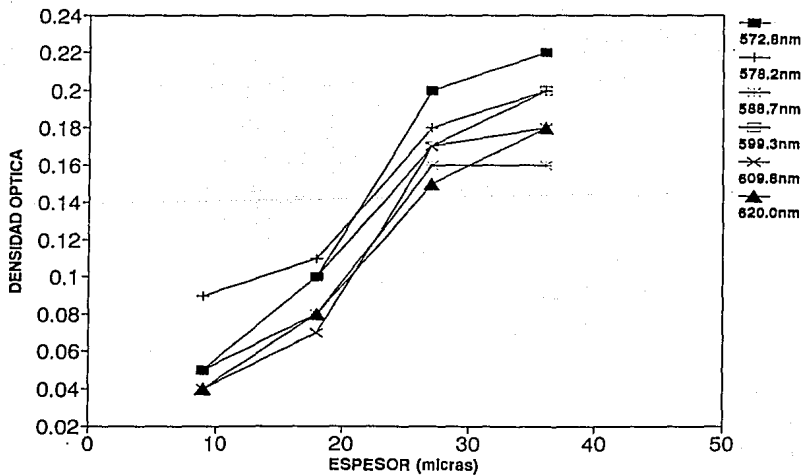
Gráfica 8b. Dependencia de la densidad óptica con el espesor del tejido con irradiación de luz láser de colorante.

### ABSORBANCIA BAZO



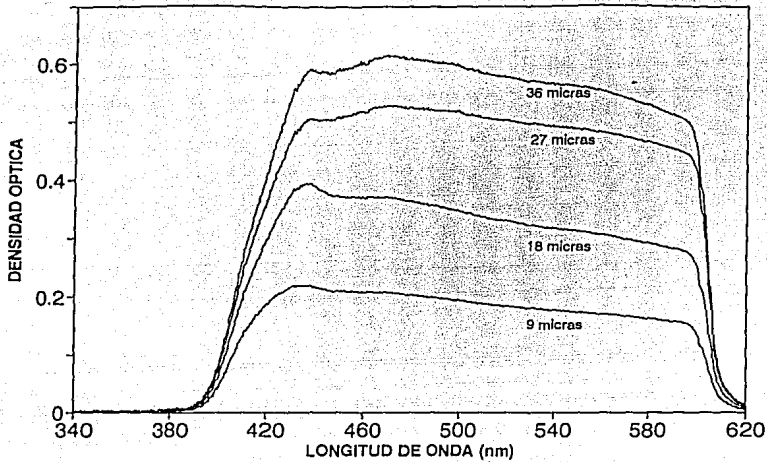
Gráfica 9a. Dependencia de la densidad óptica con el espesor del tejido con irradiación láser de argón.

### ABSORBANCIA BAZO



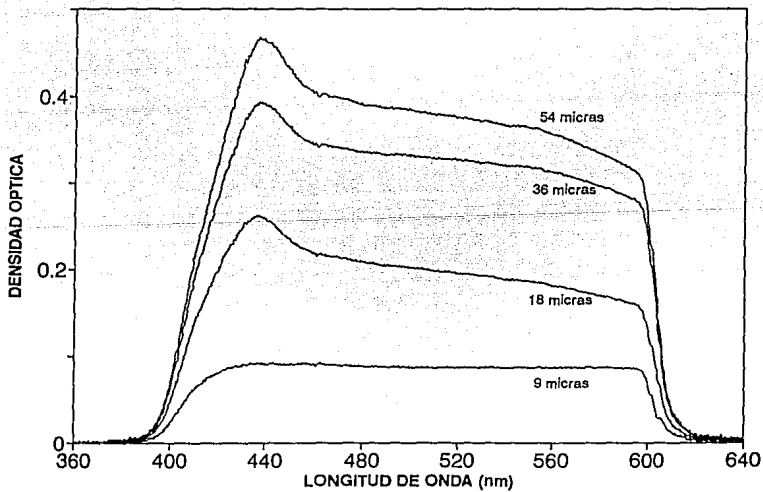
Gráfica 9b. Dependencia de la densidad óptica con el espesor del tejido con irradiación láser de colorante.

### ABSORBANCIA HIGADO



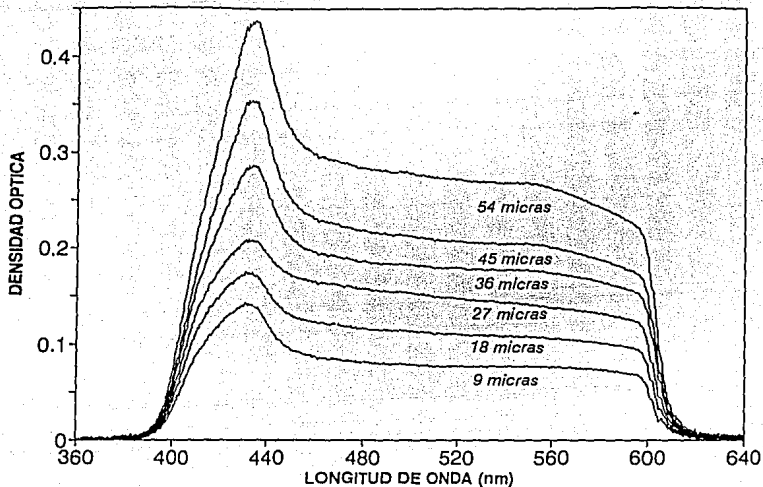
Gráfica 10a. Densidad óptica en función del espesor de un corte de hígado irradiado con lámpara de halógeno.

### ABSORBANCIA MUSCULO DE LENGUA



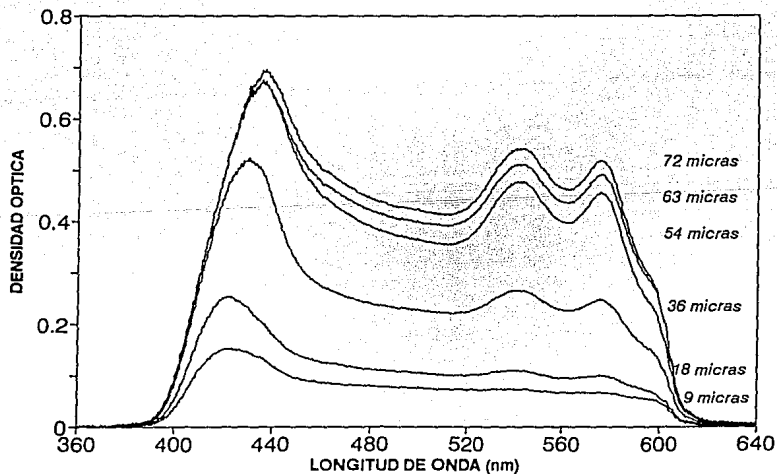
Gráfica 10b. Densidad óptica en función del espesor de un corte de músculo de lengua irradiado con lámpara de halógeno.

### ABSORBANCIA RINÓN



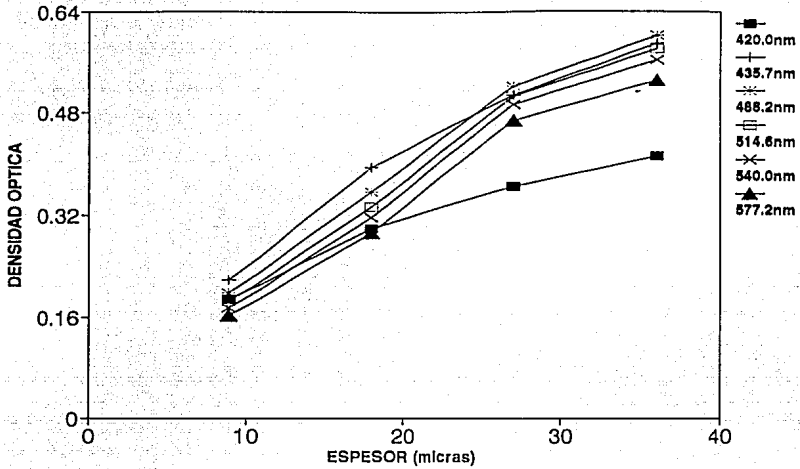
Gráfica 10c. Densidad óptica en función del espesor de un corte de riñón irradiado con lámpara de halógeno.

### ABSORBANCIA BAZO



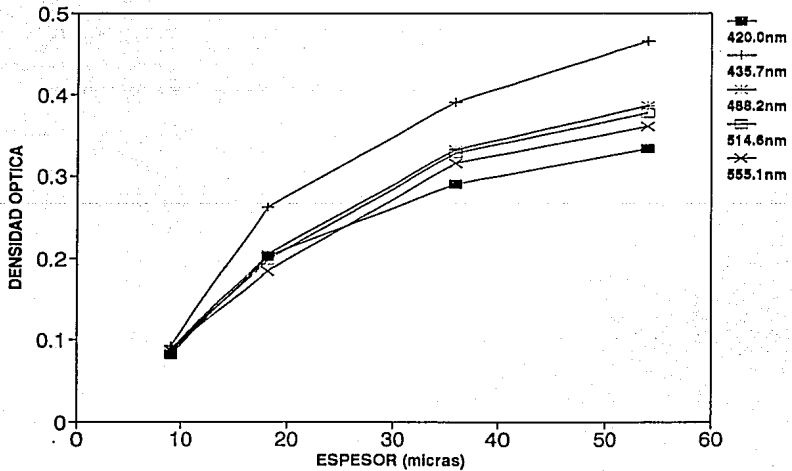
Gráfica 10d. Densidad óptica en función del espesor de un corte de bazo irradiado con lámpara de halógeno.

### ABSORBANCIA HIGADO



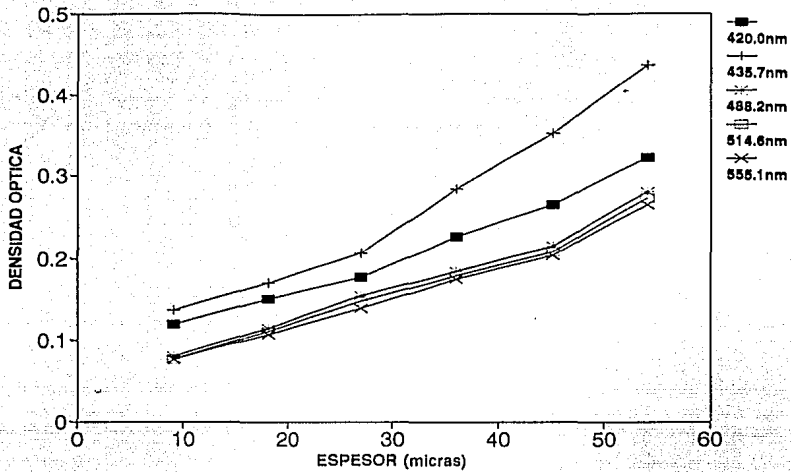
Gráfica 11a. Dependencia de la densidad óptica con el espesor de hígado con irradiación de la lámpara de halógeno.

### ABSORBANCIA MUSCULO DE LENGUA



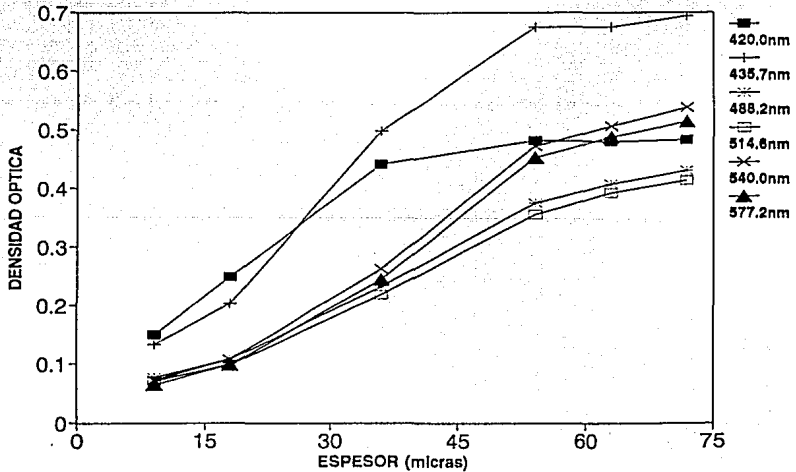
Gráfica 11b. Densidad óptica en función del espesor de músculo de lengua con irradiación de la lámpara de halógeno.

### ABSORBANCIA RIÑON



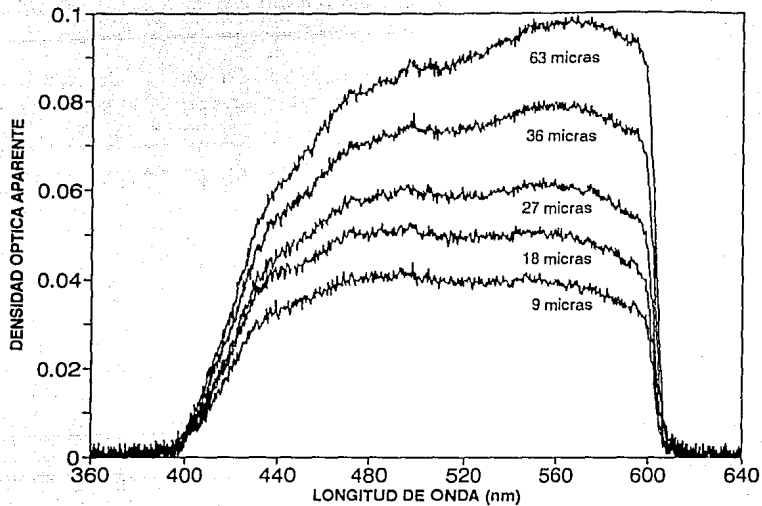
Gráfica 11c. Dependencia de la densidad óptica con el espesor de riñon con irradiación de la lámpara de halógeno.

### ABSORBANCIA BAZO



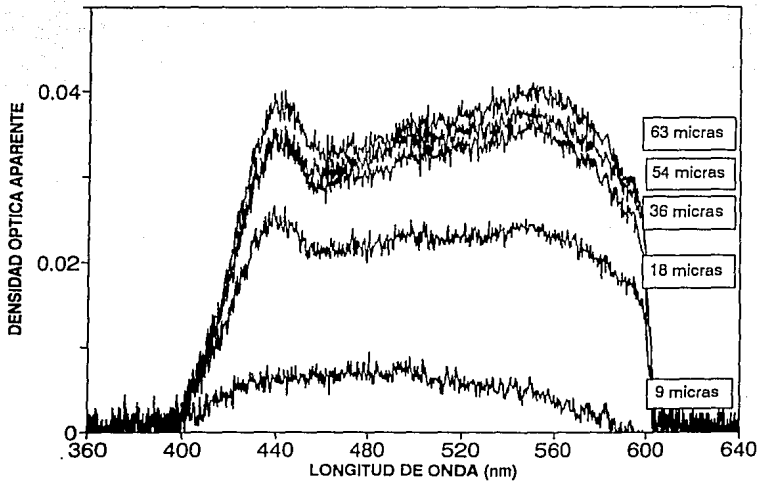
Gráfica 11d. Dependencia de la densidad óptica con el espesor de bazo con irradiación de la lámpara de halógeno.

## HIGADO



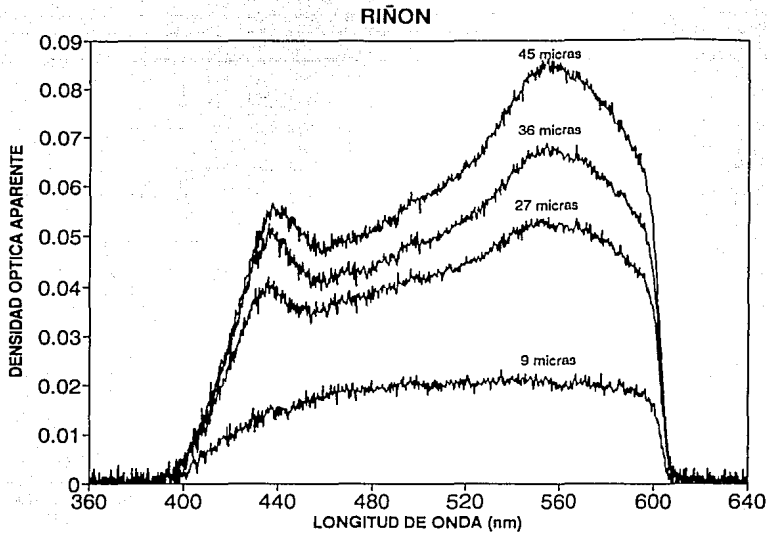
Gráfica 12a. Densidad óptica aparente en función del espesor del tejido con irradiación de la lámpara de halógeno.

## MUSCULO DE LENGUA

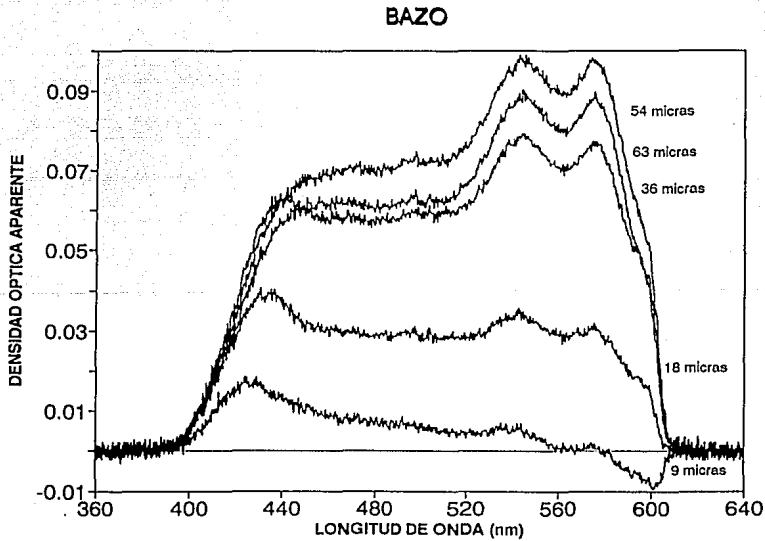


Gráfica 12b. Densidad óptica aparente en función del espesor del tejido con irradiación de la lámpara de halógeno.



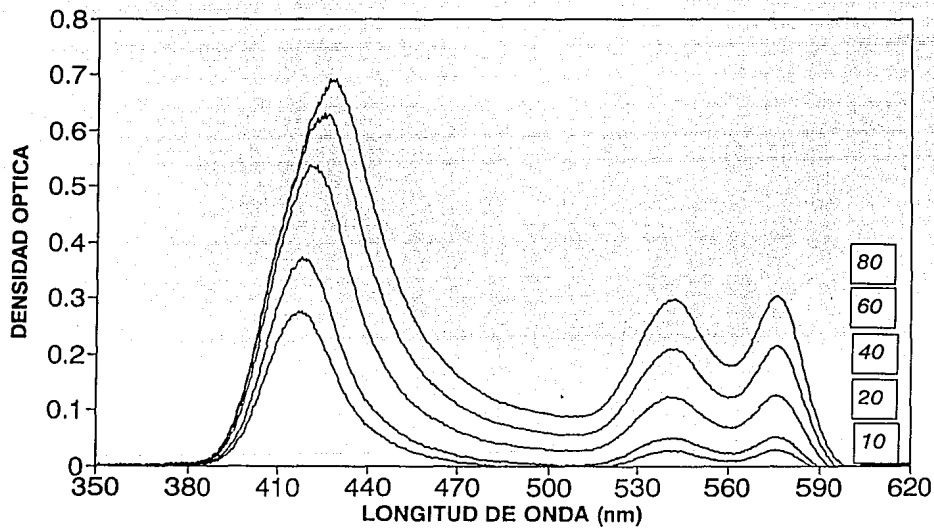


Gráfica 12c. Densidad óptica aparente en función del espesor del tejido con irradiación de la lámpara de halógeno.



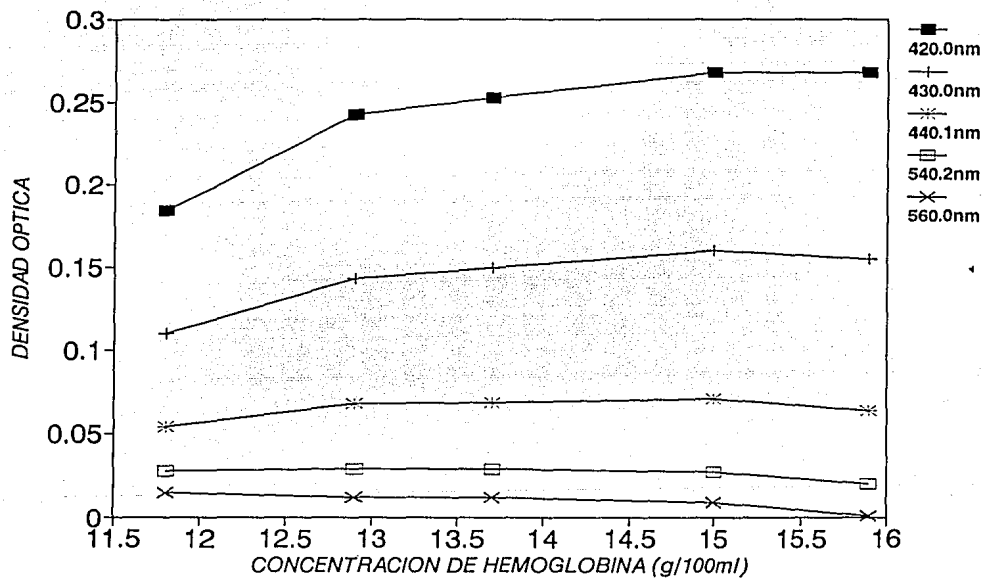
Gráfica 12d. Densidad óptica aparente en función del espesor del tejido con irradiación de la lámpara de halógeno.

## ABSORBANCIA SANGRE HUMANA



Gráfica 13. Espectros de absorción de 10 a 80 microlitros de sangre disuelta en agua destilada en función de la longitud de onda.

## HEMOGLOBINA ABSORBANCIA



Gráfica 14. Densidad óptica en función de la concentración de la hemoglobina con irradiación de luz láser.

## APENDICE A

### DETERMINACION DE LA DENSIDAD OPTICA

Las muestras irradiadas, como son la sangre o los tejidos, contienen un solvente; a la sangre se le añadió agua destilada y a los tejidos solución salina. Se midió únicamente la luz transmitida ó reflejada por la sangre ó los tejidos, según fuera el caso.

Se consideró la densidad óptica, D.O., de las muestras preparadas como la diferencia de la densidad óptica de las muestras preparadas (D.O.)<sub>m</sub> menos la densidad óptica del agua destilada o solución salina (D.O.)<sub>s</sub>, es decir:

$$\begin{aligned}
 \text{D.O.} &= (\text{D.O.})_m - (\text{D.O.})_s = \log(I_{O_m} / I_m) - \log(I_{O_s} / I_s) \\
 &= \log \frac{(I_{O_m} / I_m)}{(I_{O_s} / I_s)} \\
 &= \log \frac{I_{O_m} I_s}{I_{O_s} I_m} \tag{A-1}
 \end{aligned}$$

donde los subíndices cero representan la intensidad de luz incidente en la muestra preparada o simplemente en la solución.

En la Ec. A-1 se considera que la radiación de la fuente luminosa es constante, entonces los términos de  $I_{O_m}$  y de  $I_{O_s}$  son iguales, por lo tanto se pueden cancelar en la ecuación, resultando:

$$\text{D.O.} = \log \frac{I_s}{I_m} \tag{A-2}$$

Esta ecuación representa la densidad óptica de la sangre o de los tejidos.

En este trabajo se consideró  $I_s$  como la intensidad de luz incidente en la muestra  $I_o$ , e  $I_m$  la intensidad de luz transmitida por la muestra  $I$ . Así, la Ec. A-2 es representada por:

$$D.O. = \log \frac{I_o}{I} \quad (A-3)$$

En el caso de la densidad optica aparente,  $D.O._a$ , la cual es una medida de la reflectancia del tejido, es definida por el logaritmo del inverso de la reflectancia ( $R$ ), la situación es similar, por lo que se obtiene:

$$D.O._a = \log \frac{r_s}{r_m} \quad (A-4)$$

o para simplificar

$$D.O._a = \log \frac{r_o}{r} \quad (A-5)$$

donde  $r_o$  es la intensidad de luz reflejada por al solvente y  $r$  la intensidad de luz reflejada por la sangre (o por el tejido).

## APENDICE B

### FLUJO RADIANTE EN EL FOTOMULTIPLICADOR

Para medir la densidad óptica de las muestras se necesita de un sistema fotométrico el cual determine la cantidad de luz transmitida por la muestra. El sistema cuenta con un fotomultiplicador cuya respuesta depende del voltaje de polarización eléctrica y de la longitud de onda de la radiación incidente. Los valores para los diferentes voltajes de polarización eléctrica en el intervalo de operación de 600-900 volts, se obtuvieron para las líneas de emisión características del láser de argón y algunas líneas del láser de colorante. La corriente de salida del fotomultiplicador es convertida a flujo radiante ( $nW$ ) con la ecuación siguiente:

$$\Phi = \frac{I_c}{\rho G} \quad (B-1)$$

donde  $I_c$  es la corriente del fotocátodo,  $\rho$  la responsividad y  $G$  es la ganancia del fotomultiplicador. La responsividad ( $\rho$ ) o sensibilidad absoluta ( $S$ ) depende de la longitud de onda de la radiación (Gráfica 3a, fotocátodo S4). La variación de la ganancia del fotomultiplicador ( $dG_1$ ) depende del voltaje de polarización eléctrica de la siguiente manera:

$$dG_1/G = (0.7n) dV_1/V \quad (B-2)$$

siendo  $n$  el número de dinodos,  $dV_1$  es el voltaje de polarización eléctrica entre los dinodos,  $G=3,000,000$  y  $V=1000v$  son valores característicos típicos de ganancia y voltaje del fotomultiplicador RCA-1P21 [Harrison, N.J.].

## APENDICE C

### GLOSARIO

- AUTOLISIS - Destrucción de tejidos o células por acción de sus propias enzimas.
- CELULA - Unidad básica de todo organismo viviente limitada por una membrana.
- CROMOFORO - Grupo químico cuya presencia dá un color determinado a un compuesto. Puede tomar colorantes cuando se une con otros grupos.
- DERMIS - Porción de la piel situada por debajo de la epidermis y formada principalmente por tejido fibroconectivo denso.
- DISECCION - Separación de los tejidos y órganos del cuerpo a lo largo de las divisiones naturales.
- EFECTO DE FOTODESCOMPOSICION - Separación de los componentes del cuerpo en sus principales constituyentes por el uso controlado de rayos de luz.
- EFECTOS FOTOTERMICOS - Incremento de la temperatura en la muestra debido a la absorción de la luz, hasta producir coagulación.
- ENDOGENO - Que se origina en el interior del organismo o derivado del mismo.
- EXOGENO - Que se origina en el exterior del cuerpo, que es debido a una causa externa.
- EPIDERMIS - Capa externa de la piel constituida por epitelio plano estratificado queratizante.
- ERITROCITO - Elemento forme de la sangre de 6-8 $\mu$ m de diámetro, de forma bicóncava, deprovisto de núcleo y con alto contenido de hemoglobina.
- HEMOGLOBINA - Heteroproteína de color rojo existente en los eritrocitos, cuya principal función es unirse al O<sub>2</sub> para ser transportado a los tejidos.
- IRRADIANCIA - Es la densidad de potencia, es decir, la cantidad de energía en unidad de tiempo, que incide sobre una superficie dividida por el área de la superficie que está siendo irradiada.

**PROTEINA** - Molécula formada por una o más cadenas de aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos. Las proteínas son los compuestos esenciales del cuerpo.

**REFLECTANCIA** -Es la razón de la intensidad de la luz reflejada y la intensidad incidente sobre una superficie.

**TRANSMITANCIA** - Es la razón de la intensidad de luz transmitida entre la intensidad de luz incidente sobre una superficie.



## BIBLIOGRAFIA

Andersson-Engels, S., Johansson, J., Stenram, U., Svanberg, K. and Svanberg, S., "Malignant Tumor and Atherosclerotic Plaque Diagnosis Using Laser-Induced Fluorescence", IEEE Journal of Quantum Electronics, 26, 12:2207-2217, 1990.

Budde, W., Optical Radiation Measurements, Academic Press, New York, 1983.

Cheong, W., Prahl, S. and Welch, A., "A Review of the Optical Properties of Biological Tissues", IEEE Journal of Quantum Electronics, 26, 12:2318-2324, 1990.

Çilesiz, I.F. and Welch, A.J., "Light Dosimetry: Effects of Dehydration and Thermal Damage on the Optical Properties of the Human Aorta", Applied Optics, 32, 4:477-487, 1993.

Council Report, "Lasers in Medicine and Surgery", JAMA, 256, 7:900-907, 1986.

Das, B.B., Yoo, K.M., Liu, F., Cleary, J., Prudente, R., Celmer, E. and Alfano, R.R., "Spectral Optical-Density Measurements of Small Particles and Breast Tissues", Applied Optics, 32, 4:549-553, 1993.

Dawson, J.B., Barker, D.J., Ellis, D.J., Grassam, E., Cotterill, J.A., Fisher, G.W. and Feather, J.W., "A Theoretical and Experimental Study of Light Absorption and Scattering by in vivo Skin", Phys. Med. Biol., 25, 4:695-709, 1980.

Demtröder, W., Laser Spectroscopy, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1982.

Diccionario Médico, ed. Teide, 1990.

Feather, J.W., Ellis, D.J. and Leslie, G., "A Portable Reflectometer for the Rapid Quantification of Cutaneous Haemoglobin and Melanin", *Phys. Med. Biol.*, 33, 6:711-722, 1988.

Garcés, V., Ortega, R., Nogueira, A. y Loza, P., Centro de Instrumentos, U.N.A.M., Valero, G., Hospital de Cardiología, IMSS-SXXI-CMN., "Método de Medición del Coeficiente de Absorción Efectivo de Tejidos Biológicos", XXXV Congreso Nacional de Física, Puebla, Puebla, 26-30 de Octubre de 1992.

Garcés, V., Ortega, R. y Nogueira, A., "Calibración de un Sistema Fotométrico para Medir las Densidades Ópticas", XXXV Congreso Nacional de Física, Puebla, Puebla, 26-30 de Octubre de 1992.

Gourgouliatos, Z.F., Welch, A.J. and Diller K.R., "Measurements of Argon Laser Light Attenuation in the Skin *in vivo* Using a Unique Animal Model", *Lasers in Medical Science*, 7:63-71, 1992.

Graaff, R., Dassel, A.C.M., Koelink, M.H., De Mul, F.F.M., Aarnoudse, J.G. and Zijlstra, W.G., "Optical Properties of Human Dermis *in Vitro* and *in Vivo*", *Applied Optics*, 32, 4:435-447, 1993a.

Graaff, R., Koelink, M.H., De Mul, F.F.M., Zijlstra, W.G., Dassel, A.C.M., and Aarnoudse, J.G., "Condensed Monte Carlo Simulations for the Description of Light Transport", *Applied Optics*, 32, 4:426-434, 1993b.

Groenhuis, R.A.J., Ferwerda, H.A. and Ten Bosch, J.J., "Scattering and Absorption of Turbid Materials Determined from Reflection Measurements. 1: Theory", *Applied Optics*, 22, 16:2456-2462, 1983.

Grum, F., *Optical Radiation Measurements*, Academic Press, New York, 1979.

Harrison, N.J., *Manual del Fotomultiplicador RCA*, RCA Corporation.

Hasegawa, Y., Yamada, Y., Tamura, M. and Nomura, Y., "Monte Carlo Simulation of Light Transmission Through Living Tissues", Applied Optics, 30, 31:4515-4520, 1991.

Hemenger, R. P., "Optical Properties of Turbid Media with Specularly Reflecting Boundaries: Applications to Biological Problems", Appl. Opt., 16, 7:2007-2012, 1977.

Ishimaru, A., Kuga, Y., Cheung, R.L.-T., and Shimizu, K., "Scattering and Diffusion of a Beam Wave in Randomly Distributed Scatterers", J. Opt. Soc. of Am., 73, 2:131-136, 1983.

Lee, V.S. and Tarassenko, L., "Absorption and Multiple Scattering by Suspensions of Aligned Red Blood Cells", Opt. Soc. Am. A, 8, 7:1135-1141, 1991.

Maitland, D.J., Walsh, J.T.Jr., and Prystowsky, J.W., "Optical Properties of Human Gallbladder Tissue and Bile", Applied Optics, 32, 4:586-591, 1993.

Marchesini, R., Bertoni, A., Andreola, S., Melloni, E. and Sichirollo, A., "Extinction and Absorption Coefficients and Scattering Phase Functions of Human Tissues in Vitro", Applied Optics, 28, 12, pp. 2318-2324, 1989.

Martellucci, S., and Chester, A.N., Laser Photobiology and Photomedicine, Plenum Press, New York, 1983.

Nakamura, S., Nishiwaki, Y., Suzuki, S., Sakaguchi, S., Yamashita, Y. and Ohta, K., "Light Attenuation of Human Liver and Hepatic Tumors After Surgical Resection", Lasers in Surgery and Medicine, 10:12-15, 1990.

OSMA MANUAL, Operating and Service Manual for Models ST-100, ST-110 and ST-120, Princeton Instruments, Inc.

- Patterson, M.S., Wilson, B.C. and Wyman, D.R., "The Propagation of Optical Radiation in Tissue. I. Models of Radiation Transport and their Application", *Lasers in Medical Science*, 6:155, 1991.
- Schmitt, J.M., *Optical Measurement of Blood Oxygen by Implantable Telemetry*, Technical Report, Stanford University, Stanford, California 94305, February 1986.
- Skoog, D.A., *Principles of Instrumental Analysis*, Holt, Rinehart and Winston, Inc., USA, 1971.
- Talmi, Y., and Simpson, R.W., "Self-scanned Photodiode Array: a Multichannel Spectrometric Detector", *Applied Optics*, 19, 9: 1401-1414, 1980.
- Treviño, C., Carranza, J. y Ortega, R., "Diseño y Construcción de un Acoplador Láser - Fibra Óptica", *Instrumentación y Desarrollo*, 3, 1:33-37, 1991.
- Van Staveren, H.J., et al, "Light Scattering in Intralipid-10% in the Wavelength range of 400-1100nm", *Applied Optics*, 30, 31:4507-4514, 1991.
- Verkruyssen, W., Pickering, J.W., Beek, J.F., Keijzer, M., and Van Gemert, M.J.C., "Modeling the Effect of Wavelength on the Pulsed Dye Laser Treatment of Port Wine Stains", *Applied Optics*, 32, 4:393-398, 1993.
- Wilson, B.C. and Jacques, S.L., "Optical Reflectance and Transmittance of Tissues: Principles and Applications", *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26, 12, pp. 2186-2199, 1990.