

**CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN OPTICA, A. C.**

Tesis

Diseño y caracterización de un sistema para distinguir fotones balísticos en transiluminación de un medio esparcidor

Presenta:

Ing. Juan Arturo Aranda Ruiz

Asesor:

Dr. Gonzalo Páez Padilla

Como requisito para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Óptica)

León, Guanajuato, México; Noviembre 2003

Dedico este trabajo a mi esposa Silvia Angel O., ya que gracias a su apoyo y sacrificio pude realizar este trabajo Así como a mis hijos Lizeth, Melissa y Juan Arturo, que son mi inspiración así como a mis padres y hermanos que siempre me brindaron su apoyo.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi asesor y amigo el Dr. Gonzalo Páez Padilla el tiempo y la guía proporcionada para la realización del trabajo, tanto como las sugerencias y correcciones; así como su paciencia e interés, más allá de su deber para la realización de esta tesis. Asimismo como los consejos y comentarios de la Dra. María Strojnik.

También la invaluable ayuda en la corrección, colaboración y realización de las gráficas de este trabajo a mi compañero y amigo Dr. Eduardo López Padilla, así como a la colaboración de mis compañeros de laboratorio: Jaime Sandoval, Claudio Ramírez y mis compañeros de generación María del Socorro Hernández, María Eugenia Sánchez, Ángel Muñoz (q.e.p.d.), José Matías Hernández y Luis Álvarez, por su apoyo y amistad. Tanto como a los profesores, al personal de formación académica, de biblioteca y administrativo del Centro de Investigaciones en Óptica.

Contenido

Introducción

Capítulo 1. Estructura de los tejidos y modelos Ópticos relevantes	1
1.1 Introducción	5
1.2 Modelos continuos y discretos de los tejidos	6
1.3 Forma y tamaño de las partículas en modelos de tejidos discretos	9
1.4 Constantes ópticas de los tejidos, heterogeneidad, suavidad óptica	11
1.5 Anisotropía de los tejidos	12
1.6 Fracción del volumen ocupado por las partículas	13
1.7 Efectos del ordenamiento espacial de las partículas	14
Conclusiones	19
Referencias	19

Capítulo 2 Phantom

2.1 Introducción	22
2.2 Evaluación de las técnicas de medición	22
2.3 Aproximación directa al modelado de propiedades ópticas	23
2.4 Cálculos basados en la teoría de Mie	26
2.5 La leche de vaca como phantom	31
2.6 Preparación de un phantom para un medio que absorbe la luz	33
Referencias	34

Capítulo 3 Técnicas para la obtención de imágenes por tras iluminación

3.1 Introducción	36
3.2 Técnicas incoherentes	40
3.3 Técnicas coherentes	46
3.4 Reflectometría en el dominio espacial	49
Referencias	50

Capítulo 4 Mediciones ópticas ultrarrápidas

4.1 Introducción	52
4.2 Límites de resolución de OCT	56
4.3 Límites de sensibilidad para OCT	60
4.4 Profundidad de penetración	61
Referencias	65

Capítulo 5

5.1 Procedimiento y resultados	68
5.2 Arreglo experimental	72
referencias	83
Conclusiones	84

Apéndice A	Tablas de propiedades ópticas de los tejidos	A1
-------------------	--	----

Introducción

La tomografía es un campo de enorme importancia y prácticamente indispensable en numerosas áreas, principalmente en diagnóstico médico. Su desarrollo ha crecido enormemente desde la implementación tecnológica de Hounsfield en 1972. Como técnica fue una enorme evolución en los sistemas de formación de imágenes, al generar mapas de parámetros de propiedades de tejidos que no estaban expuestos, y por tanto era imposible su visualización directa. Las técnicas de tomografía proporcionan una manera fundamental de caracterizar propiedades químicas y físicas de las células y tejidos vivos, y podemos monitorear los cambios funcionales que ocurren dentro de ellos.

Existen diversas técnicas de tomografía, y cada una de ellas mide propiedades específicas de tejidos o materiales, y tiene una resolución y penetración características. Entre los diversos sistemas de tomografía encontramos la de absorción de rayos X, por absorción de positrones (PET), por ultrasonido y resonancia magnética (MRI). Las ondas (acústicas o electromagnéticas) modifican sus parámetros físicos al atravesar los tejidos llevando información de sus propiedades y su ubicación espacial. En general tienen excelente desempeño para el propósito para el que fueron diseñados, pero también se observan desventajas serias; por ejemplo su enorme costo (MRI), el bajo intervalo dinámico (ultrasonido), o el uso de radiación ionizante (RX, PET) sinónimo de alteraciones genéticas. Este último inconveniente limita (o aún imposibilita, como en el caso de mujeres embarazadas) el uso y la exposición a esas técnicas. Así, en la búsqueda de alternativas se ha vuelto la mirada hacia radiación no-ionizante, es decir, con energías correspondientes a longitudes del visible e infrarrojo.

El empleo de radiación ionizante no es mera casualidad, sino que se utiliza porque sus fotones exhiben trayectorias “balísticas”, es decir, prácticamente no desvían su curso, sino que sólo se absorben. Esto simplifica enormemente los algoritmos de recuperación y reconstrucción de imágenes. Las longitudes de onda entre visible e infrarrojo pudieran pensarse como ideales para realizar tomografía no invasiva (su energía no alcanza a ionizar el tejido orgánico); sin embargo, con este tipo de radiación casi no se observan fotones balísticos, pues el tejido es muy esparcivo para ese intervalo espectral.

Cuando tratamos con fotones pasando a través de tejido orgánico, estamos hablando de una razón de uno a un millón (1:1'000000) entre los fotones balísticos y los esparcidos, lo cual significa que la información útil para el algoritmo de reconstrucción (contenida en los fotones balísticos) se encuentra totalmente enmascarada por los fotones esparcidos. Aunado a lo anterior, la región amarillo-violeta del espectro tiene muy poca profundidad de penetración en tejido (limitando el grosor a probar), y la región infrarrojo mayor a los 1500 nm también presenta gran absorción. Esto nos deja utilizable el intervalo de los 600 a los 1500 nm, con el anteriormente mencionado inconveniente del esparcimiento.

El problema a atacar (y tema de esta tesis) es lograr distinguir entre los fotones balísticos y los esparcidos cuando éstos pasan a través de un medio esparcidor. Por tanto, nuestro objetivo es generar una técnica que nos permita realizar tal distinción, y basados en ésta, diseñar, armar y caracterizar un arreglo óptico que nos permita corroborar el desarrollo teórico con los resultados experimentales.

Este estudio se enfoca a medio esparcidor orgánico, por lo que se revisan en el primer capítulo las propiedades ópticas y modelos de los tejidos biológicos. Como pretendemos caracterizar el sistema, es necesario emplear los medios esparcidores estandarizados que se utilizan para simular el tejido; estos medios reciben el nombre de “phantoms”, y serán tratados en el segundo capítulo.

La clave para distinguir los fotones balísticos de los esparcidos se puede encontrar en sus características distintivas: el esparcimiento causa que los fotones tomen trayectorias más largas y muy irregulares, por lo que la trayectoria óptica es usualmente varias veces la distancia geométrica entre la entrada y la salida; adicionalmente, los fotones propagándose en el tejido se ven sometidos a esparcimiento múltiple, produciéndose una amplia gama tanto en las trayectorias tomadas como en el tiempo requerido para el arribo de fotones. Si logramos emplear un haz colimado, el problema principal radica cuando los fotones esparcidos retoman su trayectoria inicial y entonces enmascaran (se confunden) con los fotones balísticos. Esto nos lleva a pensar en las dos posibles estrategias para realizar la distinción: emplear un sistema de respuesta ultrarrápida para detectar los fotones que llegan primero (“trayectoria balística”), o aprovechar las diferencias de caminos ópticos entre ambos tipos de fotones. Así, las técnicas relacionadas a ambos tipos de estrategias se estudian en los capítulos tercero y cuarto.

Después del análisis de alternativas, se concluyó que se podría hacer un desarrollo basándose en la interferencia de ondas coherentes, y la pérdida de coherencia por el retardo en el esparcimiento. Así, empleando la técnica de transiluminación coherente, se diseñó y armó un arreglo óptico que incluía un interferómetro Mach-Zehnder, donde el haz del brazo que atravesaba la muestra se modulaba mediante un piezoeléctrico en el espejo. Para las pruebas se

emplearon medios con diferentes coeficientes de esparcimiento, controlando independientemente el coeficiente de absorción. La distinción de fotones balísticos de los esparcidos se obtuvo de la información contenida en el patrón de interferencia, y con ésta, se caracterizó el sistema. El desarrollo del modelo teórico, el diseño y la caracterización del sistema, la descripción de las pruebas, y la determinación experimental de resultados se reportan en el capítulo quinto.

1. Estructura de los tejidos y modelos Ópticos relevantes

1.1 Introducción

Como hemos mencionado, la tomografía se basa en el análisis de la información contenida en la radiación que emerge de los tejidos por los que ha pasado. En este trabajo se pretende desarrollar un método que emplee radiación no-ionizante. Es bien conocido que la radiación óptica no-ionizante es fuertemente esparcida por los tejidos biológicos, y que se presentan fenómenos de birrefringencia, dicroísmo, y cambios de polarización entre otros. La modificación de los parámetros de la radiación por estos fenómenos enmascararían la información útil para realizar la reconstrucción, y es claro que el método a desarrollar deber ser capaz de discernir lo mejor posible tal información (objetivo principal de este trabajo). Por esta razón es necesario revisar las propiedades ópticas, para fundamentar decisiones sobre la viabilidad de alguna técnica en particular.

Los tejidos biológicos son ópticamente no homogéneos por lo que el proceso de esparcimiento juega un rol importante en la propagación de la luz. La radiación esparcida contiene información de los tamaños y formas de los elementos estructurales de los tejidos, su orientación, constantes ópticas, y otros parámetros. Para extraer esta información e interpretar los resultados experimentales del esparcimiento de la luz, es necesario desarrollar un modelo óptico adecuado para el tejido y resolverlo en base a los problemas de propagación de la radiación y esparcimiento en el medio.

No hay una teoría rigurosa que describa la absorción y esparcimiento de la luz por los tejidos y las estructuras celulares. De cualquier forma, la información importante de sus propiedades ópticas puede ser obtenida estudiando los objetos modelo apropiados. La complicada estructura de los tejidos, alta concentración de partículas esparcadoras, la variabilidad de sus formas, tamaños y constantes ópticas hacen que la construcción de un modelo óptico adecuado sea muy problemático. Se puede asumir que los modelos, que son base para la ecuación de esparcimiento, podrían ajustarse a objetos reales. Las características del esparcimiento son esencialmente controladas por factores simples. Estos factores para una sola partícula son:¹ el tamaño y forma de la partícula, la estructura interna de la partícula, y la heterogeneidad inherente de la partícula.

1.2 Modelos continuos y discretos de los tejidos

Dos aproximaciones pueden considerarse para modelar el tejido: primero, como representación del tejido como un medio con una distribución espacial aleatoria de parámetros ópticos; segundo, como un ensamble discreto de esparcidores. La elección de una u otra aproximación se basa en las características del tejido bajo estudio, considerando el tipo de las características de la luz esparcida que es obtenida en el resultado del modelado. La microestructura de las células biológicas y tejidos es complicada y difícil de caracterizar cuantitativamente. La microestructura de las células o tejidos se muestra en micrografías electrónicas como fluctuaciones de densidad espacial que son el resultado de variaciones de densidad de manchas de diferentes componentes estructurales.² La mayoría de tejidos biológicos están compuestos de estructuras con tamaños que abarcan un rango muy amplio. En ausencia de un tamaño dominante, la representación de un tejido como un

ensamble de partículas independientes y aisladas falla. Es posible describir el esparcimiento de la luz en estos sistemas usando la idea de un medio continuo aleatorio con índice de refracción no homogéneo con una escala espacial variable.³ Problemas similares han sido investigados para la propagación de la luz a través de turbulencias atmosféricas¹⁷⁹ y para reflexión por superficies rugosas.⁴

La representación de un tejido como un medio no homogéneo con fluctuaciones espacialmente continuas del índice de refracción es, por ejemplo, empleado para examinar la estructura del moteado de la radiación esparcida. El interés por las propiedades de fluctuación escalable del patrón de moteado que aparecen bajo la interacción de la radiación coherente con los objetos ópticamente no-homogéneos es debida a la posibilidad de extracción de información en la estructura de objetos que causan esparcimiento.⁵

La aproximación anterior es usada en tejidos donde no hay cambios abruptos en los límites entre elementos y los cuales se caracterizan por su heterogeneidad. La figura 1 muestra la micrografía electrónica del hígado de una rata como ejemplo.⁶

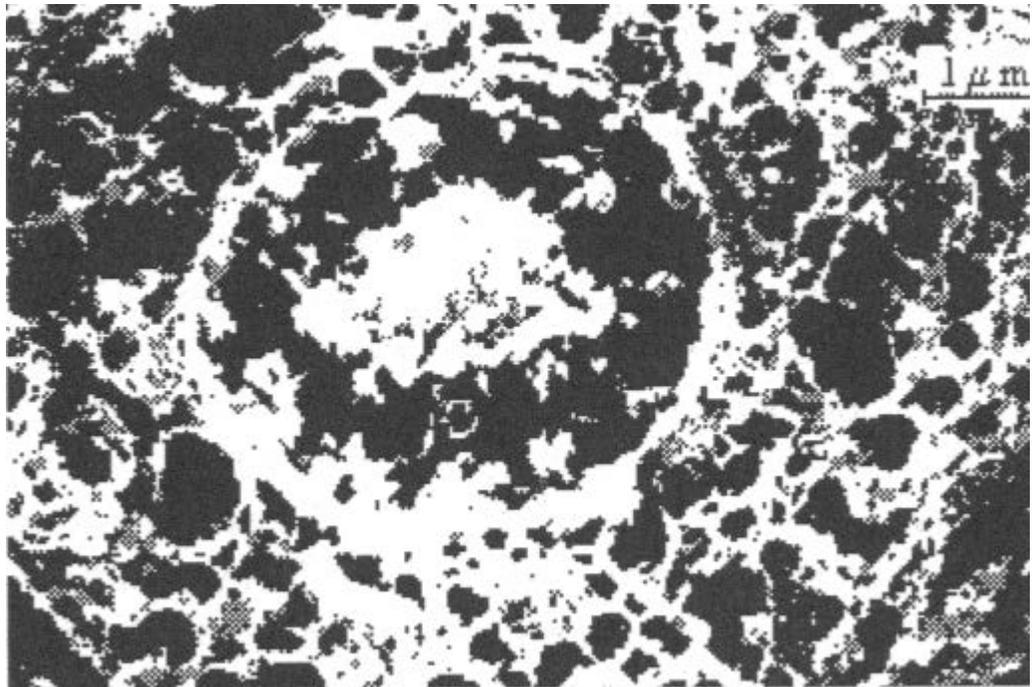


Fig. 1 Microfotografía electrónica del hígado de una rata.

La segunda aproximación para modelar tejido es su representación como un sistema de partículas esparcadoras discretas. Este modelo es utilizado ventajosamente para describir la dependencia angular de la polarización característica de la radiación esparcida.⁷ La sangre es un ejemplo del más importante sistema biológico disperso que enteramente corresponde al modelo de esparcidores discretos.

Para elegir un método y una aproximación teóricos para calcular las características de esparcimiento de un sistema de partículas es necesario considerar las características principales de la estructura del tejido, la forma y el rango del tamaño de las partículas, su índice de refracción y concentración.

1.3 Forma y tamaño de las partículas en modelos de tejidos discretos

Un medio biológico es muchas veces modelado por un conjunto de partículas esféricas homogéneas, esto tiene cierto significado ya que muchas células, microorganismos y corpúsculos sanguíneos son cercanos en su forma a esferas o elipsoides. Un sistema de partículas que no interactúan es una versión simple de este modelo. La solución de el problema de la difracción de ondas electromagnéticas en una partícula esférica es bien conocido, siendo ésta la solución de Mie.⁸ El desarrollo de este modelo involucra la consideración de una estructura de partículas esféricas,⁹ esferas multicapas y esferas con no homogeneidades radiales, anisotropía, y actividad óptica.

Para tejidos que tienen estructuras fibrosas, el modelo más apropiado sería un sistema de cilindros largos con concentraciones diferentes. El tejido muscular, la cornea y la esclerótica pertenecen a este tipo de tejido formado por fibras de colágeno. La solución del problema de difracción de un esparcidor multicapa o simple cilíndrico es también bien conocida.⁸

El tamaño de la mayoría de las células y elementos de la estructura de los tejidos biológicos varían en un rango de pocas decenas de nanómetros a cientos de micrómetros.¹⁰ Algunos ejemplos se listan a continuación. Las bacterias usualmente tienen el tamaño de pocos micrómetros.¹⁰ Los corpúsculos sanguíneos (eritrocitos, leucocitos, y plaquetas) muestran los siguientes parámetros: un eritrocito normal en el plasma tiene la forma de un disco cóncavo-cóncavo con un diámetro variando de 7.1 a 9.2 μm , su grosor en el centro 0.9-1.2 μm y 1.7-2.4 μm , respectivamente; los leucocitos están formados como esferas, de

8-22 μm de diámetro¹¹ y las plaquetas son discos delgados con diámetros de 2 a 4 μm . La mayoría de las otras células humanas están en el rango de 5-20 μm de diámetro.¹ Las mitocondrias son organelos elipsoidales que contienen membranas densamente constituidas de proteínas y lípidos. Tienen un grosor de 0.1-0.2 μm y un largo de 1-2 μm . En la capa epidérmica, las células son grandes (área de la sección transversal promedio $\approx 80 \mu\text{m}^2$) y muy uniformes en tamaño.³ Por lo cual, para la mayoría de los tejidos el parámetro del tamaño de la partícula $x = 2\pi r/\lambda$ (donde r es el radio de la partícula, λ es la longitud de onda de la radiación) y varía en un rango $1 < x < 100$ en la región del visible.

Las partículas esparcidoras en tejido biológico pueden ser pequeñas y grandes comparadas con la longitud de onda; la distribución de tamaños es esencialmente monodispersa (como tejidos del ojo por ejemplo) y muy amplia. No hay una función de distribución universal en dimensiones que pudiera describir adecuadamente todos los tejidos. Gaussiana, gamma y distribuciones de potencia son usadas como funciones de distribución de tamaños de partículas en sistemas de dispersión ópticos.¹³ Se estableció particularmente que esparcidores en la capa epidérmica de la piel presenta una distribución normal logarítmica, mientras que las fluctuaciones espaciales en el índice de refracción de tejidos densos y fibrosos, como la dermis, siguen una ley de potencias.³

En el caso donde el esparcimiento se produce en partículas de estructuras complejas, es necesario aplicar los diferentes procedimientos para calcular el esparcimiento en partículas no esféricas, por ejemplo el método de matrices T y otros¹⁴. El modelado de partículas de formas complejas por agregados de esparcidores esféricos es posible. Todo lo

presentado anteriormente presenta una amplia área de investigación; y la naturaleza específica de los tejidos no está, de cualquier manera, agotada por estas características especiales.

1.4 Constantes ópticas de los tejidos, heterogeneidad, suavidad óptica

La medición del índice de refracción para tejidos y sus componentes es uno de los problemas actuales de la óptica de los tejidos. Tales estudios se han llevado a cabo por un tiempo comparativamente grande¹⁵ pero no hay adecuada información en la literatura, aún acerca de un índice de refracción promedio para diferentes tejidos.¹⁴

La materia que rodea los esparcidores (líquido intracelular y citoplasma), la así llamada sustancia base esta compuesta principalmente de agua con sales y componentes orgánicos disueltos en ella. El índice de refracción de la sustancia base es tomado comúnmente como $n_0 = 1.35-1.37$. Las mismas partícula esparcidoras (organelos, fibras de proteína, membranas, glóbulos de proteínas) presentan una alta densidad de proteínas y lípidos en comparación con la sustancia base, por lo tanto un mayor índice de refracción $n_1 = 1.43-1.47$. Esto implica una estructura con fluctuaciones de índice de refracción binaria es uno de los modelos más simples para los tejidos.

La absorción para la mayoría de los tejidos en la región del visible es insignificante excepto las bandas de absorción de la hemoglobina en la sangre y algunos otros cromóforos. Las bandas de absorción de las moléculas de proteínas están principalmente en

la región del UV cercano. La absorción en la región del IR esta esencialmente definida por el agua contenida en los tejidos.

La parte real del índice de los eritrocitos con respecto al plasma es $m = 1.041-1.067$ ($\lambda = 600$ nm). Su parte imaginara varia dentro $10^{-2}-10^{-5}$ ($\lambda = 350-1000$ nm). El índice relativo para los linfocitos humanos varia en el rango de $1.01 < m < 1.08$.¹⁷ Los parámetros ópticos de las plaquetas no han sido estudiados ampliamente; son, de cualquier forma, referidos como partículas suaves con débil absorción (para λ mayores a 600 nm.).

Es evidente que las no-homogeneidades de los tejidos tienen tamaños comparables con la longitud de onda del rango del visible o IR cercano y un índice de refracción relativo pequeño por lo cual son considerados como ópticamente suaves.

Los coeficientes de absorción y de esparcimiento son dependientes de la longitud de onda y del tipo de tejido que atraviesan. En general, varían entre 0.5 y 5 cm^{-1} para el de absorción, y entre 0.2 y 400 cm^{-1} para el de esparcimiento, y el factor de anisotropía de esparcimiento entre 0.8 y 0.99 . En el apéndice A se muestran tablas para coeficientes de absorción, de esparcimiento y anisotropía de esparcimiento para diferentes tejidos y profundidades de penetración a diferentes longitudes de onda.

1.5 Anisotropía de los tejidos

Muchas estructuras biológicas son ópticamente anisotrópicas. Un gran número de tejidos contienen estructuras birrefringentes uniaxiales.¹⁸ El hueso, tejido muscular, y piel

están mineralizados, formados por filamentos de miosina y colágeno respectivamente. El tejido muscular la densidad de empaqueo de los haces de filamentos en un multifractal es mas alta que para el hueso, y las fibras de miosina en los músculos muestran una menor birrefringencia ($\delta n \approx 10^{-3}$). La orientación predominante de las fibras de colágeno en diferentes regiones de la cornea resulta en forma de birrefringencia y dicroísmo.¹⁹ La orientación de la estructura de los haces de colágeno en la dermis de la piel es extremadamente variable aún para pequeños espesores de una sección microscópica. Aparte de la birrefringencia lineal y el dicroísmo , muchos objetos biológicos presentan actividad óptica.

1.6 Fracción del volumen ocupado por las partículas

Un parámetro importante para el modelo de partículas discretas que definen sus propiedades ópticas, es la densidad de empaqueo o, en otras palabras, la fracción del volumen ocupada por las partículas. Esta característica puede ser encontrada experimentalmente usando un microscopio electrónico. Esta es una de las aproximaciones más directas basadas en las mediciones del espacio ocupado por un elemento de un tamaño particular. La región seleccionada es vista como una sección a través de una superficie 3D que es dividida en sub-cubos para el conteo del número de elementos con el mismo tamaño. La fracción de volumen ocupada por los elementos es proporcional al número de sub-cubos contados. Empleando este procedimiento y datos de un microscopio electrónico uno puede calcular la fracción de volumen f_i ocupado por las partículas con un tamaño d_i . Desafortunadamente pueden ocurrir errores sistemáticos que conduzcan a diferentes valores

de la fracción de volumen para grosores variables de la sección. El efecto Holmes y el teorema de Delesse se utilizan para eliminar estos errores.²¹ Estimaciones de la fracción de volumen ocupada por partículas esparcadoras puede ser calculado por comparación de los pesos de un tejido nativo y uno seco con la densidad conocida de los componentes separados del tejido.

Como regla, la fracción del volumen ocupada por las partículas esparcadoras en tejidos tales como músculo, cornea, esclerótica, y cristalino del ojo cubre de un 20 a un 40%. Convencionalmente en la sangre entera hay un contenido de aproximadamente 5×10^6 eritrocitos en 1 mm^3 . Los eritrocitos componen hasta un 40% del volumen de la sangre. La fracción del volumen de eritrocitos en la sangre f es llamada hematocrito H . Para sangre normal $H = 0.4$. El restante 60% del volumen en la sangre es plasma, (es esencialmente una solución transparente de agua con sales). La concentración de otros esparcadores podría abarcar de una fracción a pocas docenas de porcentaje.

1.7 Efectos del ordenamiento espacial de las partículas

Un rol sustancial en los tejidos es jugado por el ordenamiento espacial de las partículas que los forman. Con densidades de empaquetamiento muy pequeñas tratamos con esparcimiento incoherente simple o múltiple por partículas independientes si la fracción de volumen ocupada por las partículas es 0.1 o más, aparecen efectos de concentración coherente. La concentración de partículas esparcadoras es suficientemente alta para la mayoría de los tejidos, por lo tanto el espacio entre los esparcadores es

comparable con su tamaño. Si la distribución de tamaño de las partículas es cercana a una monodispersora, un empaquetado denso implica un grado espacial del orden en el arreglo de las partículas. Los efectos del ordenamiento espacial deben ser tomados en cuenta, para construir un modelo óptico adecuado de tales tejidos.

El ordenamiento espacial es de suma importancia en los tejidos del ojo, sin embargo, aspectos considerados después son más o menos inherentes en todos los tejidos, particularmente en la piel o los músculos. El grado de orden espacial de sistemas de partículas esparcidoras, densamente empacados asegura una alta transmisión de la cornea y el cristalino del ojo, que es responsable de que veamos el mundo que nos rodea. La cornea podría esparcir hasta el 90% de la luz incidente, con lo cual, esencialmente no observaríamos nada, si todas las partículas estuvieran ordenadas en forma aleatoria y esparcieran la luz independientemente. La situación real es, afortunadamente, muy diferente.

El efecto del esparcimiento múltiple influye mucho en la propagación de la luz en sistemas dispersores densos. La propagación de la luz en bioestructuras densamente empacadas muestra un gran número de peculiaridades intrigantes, que posibilitan al tejido óptico de los ojos, a considerarlos como cristales fotónicos naturales. Como los cristales fotónicos artificiales presentan estructuras con variaciones periódicas de índice de refracción con escalas características en el orden de la longitud de onda de la luz, bioestructuras estadísticamente ordenada muestran regiones de alta transmisión espectral y una banda de frecuencias, para las cuales la propagación de ondas electromagnéticas esta prohibida. Las bandas prohibidas son debidas a efectos del esparcimiento de luz en un

sistema de partículas ordenadas. La posición y profundidad de estas bandas de supresión depende fuertemente de su tamaño, índice de refracción, y arreglo espacial de las partículas esparcidoras. Esto es convenientemente ilustrado comparando las propiedades ópticas de la cornea con las de la esclerótica (Fig. 2).

La cornea es la parte frontal de la cápsula fibrosa del ojo, su diámetro es alrededor de ≈ 10 mm. La esclerótica es el tejido opaco y turbio que cubre cerca del 80% del ojo y sirve como membrana protectora, y junto con la cornea provee una reacción contra las

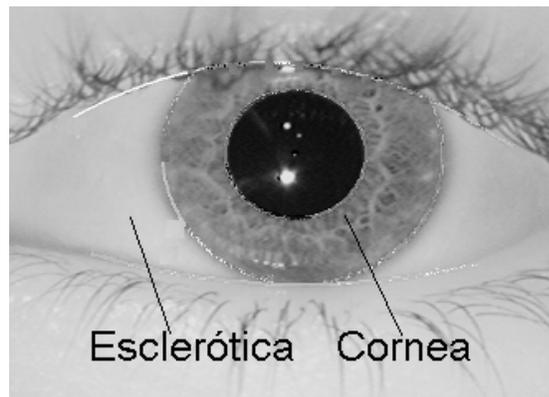


Fig. 2 El ojo humano. La cornea es el tejido transparente de la superficie anterior del ojo. La esclerótica es lo blanco del ojo y es opaco.

fuerzas internas y externas, manteniendo la forma del ojo.

Ambos tejidos están compuestos de fibras de colágeno inmersas en una sustancia base mucopolisacárida.²⁰ Las fibras de colágeno tienen una forma cercana a la de un cilindro. Están empacadas en haces como láminas normales a la superficie. Todas las fibras están alineadas dentro de cada lámina casi en paralelo con las otras y el plano de la lámina. Los índices de refracción para las fibras y la sustancia base que las rodea difieren marcadamente y es de 1.470 y 1.345 respectivamente.

El diámetro de las fibras de la cornea varía de 20 a 31 nm, para diferentes especies de animales, pero sus variaciones son de menos del 10% para cada especie en concreto del hombre o animales, las fibras son muy uniformes en diámetro. El espacio entre los ejes de las fibras es de 50-60 nm.

El rango de los diámetros de las fibras de colágeno de la esclerótica es más amplio de 25 a 230 nm. El espacio entre fibras adyacentes dentro del haz es de alrededor de 100-300 nm.²² Como se mencionó anteriormente, las fibras de colágeno están empacadas en haces y casi en paralelo unas con otras, pero no tan regularmente como en la cornea. Además, grupos de fibras en un cierto haz están divididas unas de otras por regiones comparativamente más grandes que están distribuidas en forma aleatoria en el espacio.

Mientras que ambos tejidos están compuestos de componentes moleculares similares, tienen microestructuras muy diferentes y por lo tanto funciones fisiológicas muy diferentes. La esclerótica del ojo es opaca a la luz, esparciendo en casi todas las longitudes de onda en el rango del visible, por lo cual aparece blanca. La cornea es transparente, permitiendo, que más del 90% de la luz incidente sea transmitida. Las fibras de colágeno en la cornea tienen un tamaño y espacio mucho más uniforme, que los de la esclerótica,²³ resultando en un mayor grado de orden espacial en la organización de las fibras en la cornea comparada con la esclerótica (Fig. 3).^{24, 25}

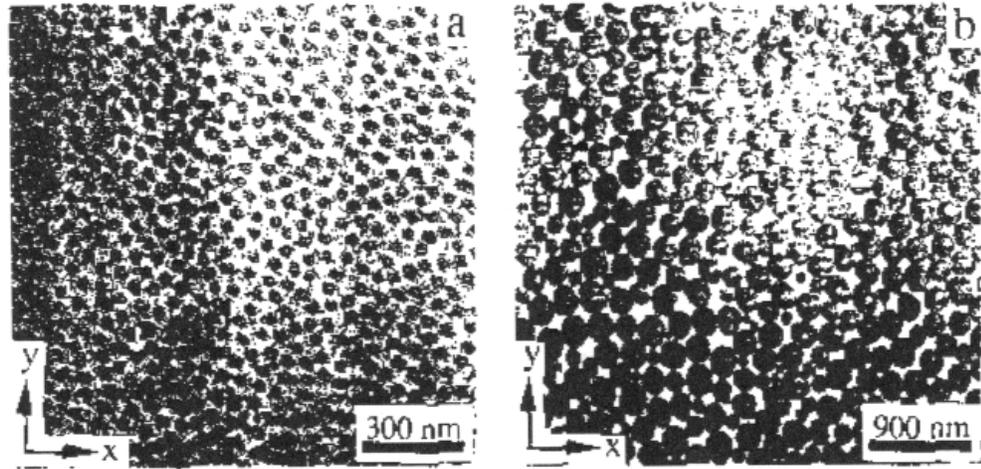


Fig. 3 Micrografías de alta resolución de la cornea (a) y de la esclerótica (b), mostrando la sección transversal de las fibras de colágeno [círculos negros embebidos en la sustancia base (áreas claras)]. Los ejes x -y de las micrografías representan dimensiones espaciales en nm.²⁴

Se cree que el orden espacial, el tamaño pequeño y el espacio de las fibras de colágeno son responsables de la transparencia de la cornea, mientras que la carencia de orden espacial, el gran tamaño y el espacio entre las fibras son las responsables de la opacidad de la esclerótica.

La transmitancia de un sistema dispersor densamente empacado puede ser calculado usando la función de distribución radial $g(r)$, el cual describe estadísticamente el arreglo espacial de las partículas en este sistema. La función de distribución radial de centros esparcidos $g(r)$ puede ser calculada para algunos tejidos con la evidencia obtenida con un microscopio electrónico. La técnica experimental de obtención de $g(r)$ implica el conteo de el número de partículas, puestas en un espacio específico de una partícula inicial arbitrariamente elegida, seguida por su promedio estadístico sobre todo el ensamble. En un caso bidimensional, el número de partículas ΔN en el espacio de r a $r + \Delta r$ esta relacionado con la función $g(r)$ por la siguiente ecuación:

$$\Delta N = 2\pi\rho g(r)r\Delta r, \quad (1)$$

donde ρ es el número promedio por unidad de área.

Conclusión

Según revisamos en este capítulo, el modelado discreto de los tejidos (es decir, formado por partículas) es en general más apropiado. Sin embargo, el tamaño, la orientación, el arreglo y la forma de las partículas en el tejido biológico son muy variados, lo cual dificulta los modelos. En cuanto al tamaño relativo de la partícula respecto a la longitud de onda, es trascendente enfatizar que varía en un intervalo entre 0.5 y 30 en la región del visible-infrarrojo cercano. Esto nos permite asumir que la distribución de luz esparcida no es simétrica ni tan dependiente de la longitud de onda (básicamente esparcimiento de Mie). El índice de refracción del tejido en general (1.35-1.37) es cercano al del agua, que es importante tomar en cuenta porque presenta un efecto refractivo que no se puede ignorar. La birrefringencia es del orden de $\delta n \approx 10^{-3}$. Para poder determinar la cantidad de radiación que esperamos que emerja del tejido, es significativo considerar que en general, el coeficiente de absorción varía entre 0.5 y 5 cm^{-1} y el de esparcimiento entre 0.2 y 400 cm^{-1} . Estos valores son dependientes del tipo de tejido y de la longitud de onda, siendo en infrarrojo de 1200 nm varios órdenes de magnitud más penetrante que el azul.

Referencias

1. P. Latimer, "Light scattering and absorption as methods of studying cell population parameters," *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* Vol. 11, no. 1, pp. 129-150 (1982).
2. M. A. Hayat, *Principles and Techniques of Electron Microscopy, Biological Applications* Vol. 1 Van Nostrand Reinhold, New York (1970).

3. G. Kumar and J. M. Schmitt, "Micro-optical properties of tissue," *Proc. SPIE* Vol. 2679, pp. 106-116 (1996).
4. J. A. Ogilvy, *Theory of Wave Scattering from Random Rough Surfaces*, Hilger, Bristol (1991).
5. D. A. Zimnyakov, V. V. Tuchin, and A. A. Mishin, "spatial speckle correlometry in applications to tissue structure monitoring," *Appl. Opt.* Vol. 36, pp. 5594-5607 (1997).
6. O. V. Volkova, V. A. Shakhmatova, and A. A. Mironova (eds.), *Atlas of Scanning Electron Microscopy Images of cells, Tissue, and Organs*, Medicine, Moscow (1987).
7. S. Ya. Sid'ko, V. N. Lopatin, and L. E. Paramonov, *Polarization Characteristics of Suspensions of Biological Particles*, Nauka, Novosibirsk (1990).
8. C. F. Bohren and D. R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley, New York (1983).
9. M. I. Mishchenko, J. W. Hovenier, and L. D. Travis (eds.), *Light Scattering by Nonspherical Particles: Theory, Measurements, and Applications*, Academic Press, San Diego (2000).
10. R. D. Dyson, *Cell Biology: A Molecular Approach*, Allyn and Bacon, Boston (1974).
11. A. P. Ivanov, A. Ya. Khairullina, and T. N. Kharkova, "experimental detection of cooperative effects in a dispersing volume," *Opt. Spectrosc.* Vol. 28, no. 2, pp. 380-387 (1970).
12. N. G. Khlebtsov, "Optics of fractal clusters in the anomalous diffraction approximation," *J. Mod. Opt.* Vol. 40, no.11, pp. 2221-2235 (1993).
13. K. S. Shifrin, *Physical Optics of Ocean Water*, American Institute of Physics, New York (1988).
14. V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*, SPIE Tutorial Texts in Optical Engineering, Vol. TT38 (2000).
15. G. B. Benedek, "Theory of transparency of the eye," *Appl. Opt.* Vol. 10, no 3, pp.459-473 (1971).
16. A. Brunsting and P. Mullaney, "Differential light scattering from spherical mammalian cells," *Biophys. J.* Vol. 14, pp. 439-453 (1974).
17. K. W. Keohane and W. K. Metcalf, "The cytoplasmic refractive index of lymphocytes, its significance and its changes during active immunization," *Quart. J. Exper. Physiol. Cognate Med. Sci.* Vol. 44, pp. 343-346 (1959).
18. O. V. Agelski, A. G. Ushenko, A. D. Arkhelyuk, S. B. Ermolenko, and D. N. Burkovets, "Scattering of laser radiation by multifractal biological structures," *Opt. Spectrosc.* Vol. 88, no 3, pp. 444-447 (2000).
19. V. F. Izotova, I. L. Maksimova, I. S. Nefedov, and S. V. Romanov. "Investigation of Muller matrices of anisotropic non homogeneous layers in application to optical model of cornea," *Appl. Opt.* Vol. 36, no. 1, pp. 164-169(1997).
20. Q. Zhou and R. W. Klिंगhton, "Light scattering and form birefringence of parallel cylindrical arrays that represent cellular organelles of the retinal nerve fiber layer," *Appl. Opt.* Vol. 36, no. 10, pp. 2273-2285 (1997).
21. J. D. Bancroft and A. Stevens (eds.) *Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, Edimburg, New York (1990).
22. D. M. Maurice, *The Cornea and Sclera. The Eye*, H. Davson (ed.), pp. 1-158, Academic Press, Orlando (1984).

23. M. S. Borcharding, L. J. Blasik, R. A. Sittig, J. W. Bizzel, M. Breen, And H. G. Weinstein, "Proteoglycans and collagen fiber organization in human corneoscleral tissue," *Exp. Eye Res.* Vol. 21, pp. 59-70 (1975).
24. S. Vaezy and J. I. Clark, "Quantitative analysis of the microstructure of the human cornea and sclera using 2-D Fourier methods," *J. Microsc.* Vol. 175, Pt. 2, pp. 93-99 (1994).
25. O. V. Angelsky and P. P. Maksimyak, "Optical correlation diagnostics of random fields and objects," *Opt. Eng.* Vol. 34, no. 4, pp. 937-981 (1995).

2. “Phantom”

2.1 Introducción

Actualmente estamos atestiguando un crecimiento estable en el interés en métodos ópticos para diagnóstico y tratamiento médico. La razón para este crecimiento es que los métodos ópticos tienen la ventaja inherente de ser no invasivos. Muchos grupos de investigadores trabajan en los fundamentos teóricos y técnicas de medición que permitan la reconstrucción de las propiedades ópticas intrínsecas de los tejidos de las señales ópticas que son medidas, procedentes de los objetos ópticos. La localización y detección de las no homogeneidades ópticas, como tumores o hematomas, dentro de los tejidos, es un ejemplo; otro ejemplo es el desarrollo de métodos terapéuticos (ablación selectiva, fototerapia, etc.), los cuales necesitan valorar la intensidad de los campos electromagnéticos dentro del tejido u órgano que es tratado.

2.2 Evaluación de las técnicas de medición

De cualquier manera, la evaluación de las técnicas de medición y validación de las predicciones teóricas en la propagación de la luz en los tejidos se logra difícilmente en experimentos directos en los actuales bio-objetos. Uno encuentra una amplia variación de los parámetros morfológicos y bioquímicos, que están más allá del control del experimentador. Si el equipo de diagnóstico es el usado diariamente, entonces es preciso desarrollar métodos de calibración estables y reproducibles. Con este propósito, se necesita

utilizar objetos de prueba, estables y repetibles, que simulen las características ópticas de los tejidos.

La propagación de la luz en un medio turbio ópticamente heterogéneo, como los tejidos biológicos los cuales son predominantemente esparcidos de la luz en el rango visible, es comúnmente descrita por ecuación de transporte de Boltzmann. Esta ecuación toma en cuenta las propiedades ópticas del tejido con el coeficiente de absorción μ_a , el coeficiente de esparcimiento μ_s , y la función de esparcimiento de fase. Estas cantidades forman la base del modelo del tejido “phantom”. La propagación de la luz en un medio artificial es considerada similar a la del tejido orgánico en sí, cuando μ_a , μ_s , y el factor de anisotropía(como una aproximación de la función de fase), g , de el “phantom” son similares a los valores encontrados en un objeto natural. En tejidos suaves, valores típicos de los coeficientes son $\mu_a \approx 0.5$ a 5.0 cm^{-1} , $\mu_s \approx 0.2$ a 400 cm^{-1} , y $0.8 < g < 0.99$ en los rangos de visible e infrarrojo cercano.

Cuando la aproximación de difusión a la ecuación de Boltzmann es usada para el problema bajo estudio, y la forma de la función de fase no es esencial, el modelado de solo dos parámetros- μ_a y el coeficiente de transporte por esparcimiento, $\mu'_s = \mu_s (1-g)$ provee la similitud necesaria para la propagación de la luz. Para algunos propósitos, la similitud entre propiedades ópticas del “phantom” y el tejido puede estar en el nivel de valores iguales del coeficiente de difusión, $D = \mu_a / \mu_{eff}^2$, donde μ_{eff} es el coeficiente de atenuación efectivo $\mu_{eff}^2 = 3\mu_a[\mu_a + \mu_s(1-g)]$. Bajo esta base se pueden desarrollar modelos a escala, en

los cuales la absorción y el esparcimiento de la luz actúa de la misma manera como en un tejido pero sobre dimensiones mayores.

Cuando la tarea es modelar un tejido con una arquitectura compleja, o todo un órgano, o preparar el objeto de muestra para una evaluación de técnicas de obtención de imágenes, la geometría “macroscópica” del objeto natural debe ser reproducida en un “phantom”. Una de las características más comúnmente encontrada es la estructura en capas de los tejidos, como la piel, cabeza humana y la cerviz.

Cuando los “phantoms” de estructuras complejas son desarrollados, los índices de refracción de las capas deben ser tomados en cuenta por que la disparidad en las interfases puede influenciar la propagación de la luz dentro del tejido. El valor del índice de refracción juega un papel importante cuando es modelada la interfase aire-tejido, los valores típicos aceptados para tejido suave son de 1.33 a 1.5 .¹

2.3 Aproximación directa al modelado de propiedades ópticas

Una aproximación directa al modelado de propiedades ópticas de los tejidos es reproducir los coeficientes de esparcimiento y absorción independientemente mezclando la proporciones adecuadas de medios que solamente esparcen la luz, con medios que solamente absorben. Estos últimos incluyen colorantes, que presentan un esparcimiento despreciable.

Ambos medios, los que esparcen y los que absorben, están suspendidos en un medio transparente apropiado (material base), el cual forma el volumen del “phantom”. Un requerimiento de las propiedades ópticas del material base, aparte de no absorber ni esparcir, es que el valor del índice de refracción sea cercano al valor encontrado en el tejido a examinar.

De acuerdo a las propiedades mecánicas del anfitrión (material base) usado, los “phantoms” de tejido pueden ser divididos en dos clases, líquidos y sólidos. Los “phantoms” líquidos en los cuales los absorbedores y los esparcidos son mezclados en un diluyente apropiado, son relativamente fáciles de preparar, de cualquier forma, fabricar muestras de complejidad real no es posible.² Tales modelos han sido usados comúnmente en modelado de medios infinitos o semi-infinitos con absorción y esparcimiento. La ventaja del “phantom” líquido es que los detectores de radiancia pueden moverse fácilmente dentro del volumen del “phantom”.

En los “phantoms” sólidos el material anfitrión sirve como base mecánica. Materiales anfitriones típicos son polímeros^{2,8,12,13,16,18} y geles acuosos.^{2-4,7,9,10,11,15} La capacidad de mantener una forma deseada de estos materiales nos da la oportunidad de manufacturar “phantoms” no homogéneos de geometría compleja. Por ejemplo órganos completos pueden ser simulados cortando y apilando rebanadas o usando técnicas de moldeo. Una de las ventajas de tales medios es que el emparejamiento de los índices de refracción en las interfaces es casi perfecto debido a la ausencia de paredes o particiones. Además la agregación y sedimentación de partículas esparcidas, un problema común en

“phantoms” líquidos, no es problema en “phantoms” sólidos, la dureza del material base no permite que las partículas se muevan.

En el diseño sistemático de “phantoms” de tejido es importante que los parámetros ópticos de la muestra sean predecibles de las características individuales de sus constituyentes y de la composición del sistema. La implementación práctica de los métodos crea restricciones adicionales.² Por ejemplo, parámetros físicos del sistema deben ser temporalmente estables, lo cual incluye no solo parámetros ópticos sino también estabilidad mecánica (evaporación de solventes, envejecimiento de polímeros, degradación de los constituyentes por bacterias). Además el proceso de preparación debe ser tan simple, rápido y seguro como sea posible.

2.4 Cálculos basados en la teoría de Mie

Cálculos basados en la teoría de Mie son convencionalmente hechos para predecir propiedades de esparcimiento de partículas en suspensión que simulan el esparcimiento por los tejidos. Aunque la teoría de Mie es estrictamente aplicable solo en el caso de algunas partículas de forma regular, sus predicciones son muchas veces aceptables para partículas de forma irregular. La teoría utiliza la sección transversal de esparcimiento, $\sigma_s(\text{cm}^2)$, y la anisotropía de esparcimiento, g . Para partículas sin absorción estos dos parámetros están dados por¹⁹

$$\sigma_s = \left(\lambda_0^2 / 2\pi m_0^2 \right) \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \left(|a_n|^2 + |b_n|^2 \right), \quad (2.1)$$

$$g = \frac{\lambda_0^2}{\pi n_0^2 \sigma_s} \left\{ \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \operatorname{Re}(a_n b_n^*) + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{n+1} \operatorname{Re}(a_n a_{n+1}^* + b_n b_{n+1}^*) \right\}, \quad (2.2)$$

donde

$$a_n = \frac{\psi_n(\alpha) \psi_n'(m\alpha) - m \psi_n(m\alpha) \psi_n'(\alpha)}{\xi(\alpha) \psi_n'(m\alpha) - m \psi_n(m\alpha) \xi_n'(\alpha)}, \quad (2.3)$$

$$b_n = \frac{m \psi_n'(m\alpha) \psi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha) \psi_n'(\alpha)}{m \psi_n'(m\alpha) \xi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha) \xi_n'(\alpha)}, \quad (2.4)$$

$$m = \frac{n_p}{n_0}; \quad \alpha = \frac{2rn_0\pi}{\lambda_0}, \quad (2.5)$$

r = radio de la partícula esférica esparcidora (cm), λ_0 = longitud de onda en el vacío (cm), $\psi_n, \xi_n, \psi_n', \xi_n'$ = las funciones Ricatti-Bessel de primera y segunda clase, n_0 = índice de refracción del material base, n_p = índice de refracción del material de las partículas esparcadoras, y * denota el complejo conjugado.

Cuando todos los eventos de esparcimiento pueden ser tratados independientemente (la fracción del volumen de los esparcidores no debe exceder del 1 al 10%), el coeficiente de esparcimiento (cm^{-1}) puede ser expresado con σ_s como $\mu_s = \sigma_s \cdot \rho$, donde ρ es la densidad de partículas que esparcen (cm^{-3}). Para partículas que absorben se considera un índice de refracción complejo y las expresiones relevantes de la teoría de Mie producen σ_s, σ_a (sección transversal de absorción, la cual da $\mu_a = \rho \cdot \sigma_a$), y g .

De las expresiones de arriba puede ser fácilmente visto que las características de las partículas que gobiernan el esparcimiento son el radio, r , el índice de refracción, n_p . Los

parámetros de control son las razones r/λ_0 y n_p/n_0 , lo cual implica que μ_s y g para unas partículas dadas depende de la longitud de onda de la radiación y del material anfitrión o base utilizado.

Cálculos basados en la teoría de Mie² predicen que el coeficiente de transporte por esparcimiento de una suspensión de partículas aumenta vertiginosamente cuando n_p/n_0 parte de la unidad (Fig. 1a). La simetría alrededor de $n_p/n_0 = 1$, significa que la dispersión con $n_p/n_0 < 1$, puede ser usada como medio de esparcimiento en “phantoms”. Tales medios pueden ser espumas, por ejemplo, considerando que el tamaño de las burbujas pueda ser controlado durante la preparación. Si n_p es cercano a n_0 , partículas lo suficientemente grandes ($r > 5\lambda$) esparcen la luz principalmente en la dirección hacia delante y el factor de anisotropía g se aproxima a 1 (Fig. 1b.) . La figura 1c muestra que el coeficiente de transporte por esparcimiento de suspensiones con fracciones de volumen constante de partículas maximizan cuando las dimensiones de las partículas es comparable (o del mismo orden) con la longitud de onda de la luz. En las Figs. 1(c-d), secciones de las superficies características ($2r = \text{const.}$) revelan la dependencia de la longitud de onda de los parámetros de esparcimiento para una partícula de tamaño dado. En los cálculos n_p y n_0 se asumieron independientes de λ_0 ; Entonces las variaciones espectrales de μ_s' y g están relacionadas solo con la influencia del parámetro α en las formulas de Mie.

El esparcimiento por partículas que son pequeñas o comparables en tamaño con la longitud de onda es espectralmente dependiente; el coeficiente de transporte por

esparcimiento decrece con λ_0 . En el caso de esparcidores de gran diámetro, μ'_s es casi constante. La dependencia espectral del parámetro de anisotropía de esparcimiento para diferentes tamaños de partículas es similar. Las características de esparcimiento de partículas grandes casi no muestra dependencia de la longitud de onda, mientras que para

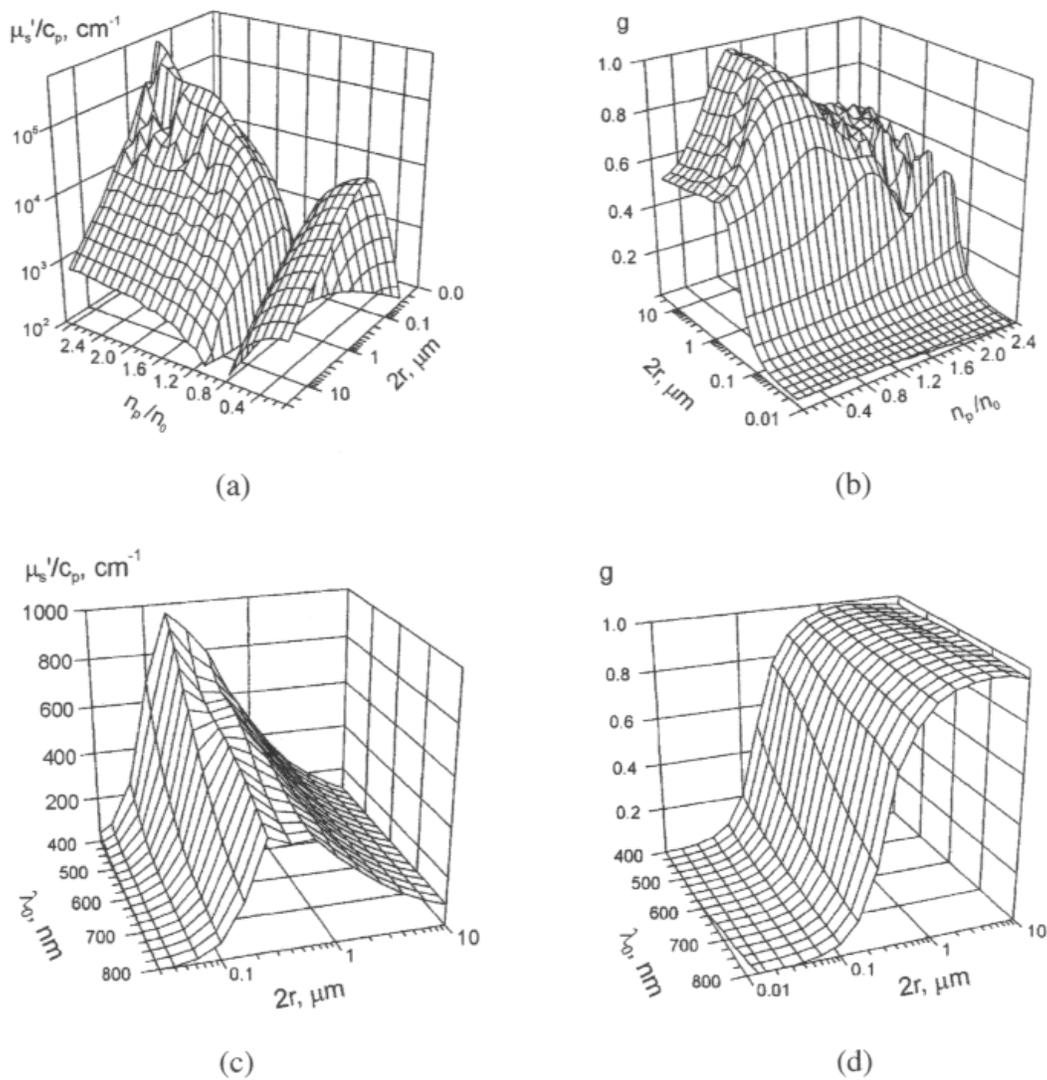


Fig. 1 Propiedades del esparcimiento utilizando la teoría de Mie para partículas no absorbentes esféricas: (a), (b) en $\lambda_0 = 633 \text{ nm}$; (c), (d) en $n_p/n_0 = 1.07$. c_p es la fracción de volumen adimensional de las partículas esparcidoras en suspensión.⁸

partículas de diámetros comparables o más pequeñas que la longitud de onda muestran una fuerte dependencia de la longitud de onda.

Los tejidos biológicos generalmente muestran altos valores g (típico para partículas grandes) también como un rápido incremento en el coeficiente de transporte por esparcimiento hacia las longitudes de onda más cortas (típico para esparcidores pequeños). Esta observación no puede ser modelada usando una suspensión de partículas monodispersas. Por lo cual se sugiere, que una mezcla de partículas grandes y pequeñas puede adecuarse mejor a la simulación de tejidos reales.^{2,20}

Cuando una mezcla de partículas o una suspensión con una amplia distribución de tamaños de partículas es empleada, los parámetros de transporte efectivo del medio esparcidor pueden ser expresados, siguiendo a Beck et al.,² en términos de valores promedio ponderados por fracciones de volumen de partículas de diferentes tamaños:

$$\mu_s = \frac{3c_p}{4\pi} \sum_i \frac{\sigma_{si} \nu_i (1 - g_i)}{r_i^3}, \quad (2.6)$$

$$g = \frac{\sum_i \frac{\sigma_{si} \nu_i g_i}{r_i^3}}{\sum_i \frac{\sigma_{si} \nu_i}{r_i^3}}, \quad (2.7)$$

donde c_p es la fracción del volumen de la suspensión ocupada por las partículas; ν_i es la fracción de volumen de partículas de radio r_i , calculado como $(r_i^3 \nu_i) / \sum_i r_i^3 \nu_i$; ν_i es el número relativo de partículas de radio r_i en suspensión; σ_{si} es la sección transversal de

esparcimiento para partículas de radio r_i ; g_i es el factor de anisotropía de esparcimiento para partículas de radio r_i .

Cuando se va usar un “phantom”, con diferentes longitudes de onda, la dependencia espectral del índice de refracción debe ser conocida. Una manera de lograr esto es utilizar una aproximación como el ajuste de Cauchy de la forma⁶

$$n(\lambda) = n_0 + n_2 / \lambda^2 + n_4 / \lambda^4 + n_6 / \lambda^6, \quad (2.8)$$

2.5 La leche de vaca como “phantom”

La leche de vaca ha sido utilizada como “phantom” para obtener un gran número de mediciones.^{5,14,17,21,22} El sistema de partículas esparcidoras en la leche comprenden dos sistemas: (1) emulsión de esferas de grasa, y (2) partículas de proteínas coloidales el tamaño de las esferas cae en el rango de 0.5-20 μm . La mayoría de las partículas tienen un diámetro de 2-4 μm . (concentración de $3 \times 10^{-3} \text{cm}^{-3}$). Las dimensiones de la fracción de proteínas están distribuidas dentro un rango de 0.02-1 μm como sigue: 0.02-0.04 $\mu\text{m} = 30\%$; 0.04-0.08 $\mu\text{m} = 30\%$; 0.15-1 $\mu\text{m} = 10\%$.¹⁴ Tanto la leche entera como la leche descremada son utilizadas en la preparación de “phantoms”. Sus propiedades de esparcimiento suelen diferir, en el último caso la fracción de partículas grandes, lo cual implica un mayor valor de g y una menor dependencia de la longitud de onda, es removida. Las propiedades ópticas de la leche entera homogenizada (3.5% grasa) y leche diluida fueron estimadas tanto en visible como en infrarrojo cercano usando el método de transmitancia resuelto en el tiempo por

Wabnitz et al.²¹ Aquí el índice de refracción e la suspensión fue tomado como $n = 1.33$, y el grosor de la muestra fue de 2 cm:

% Fracción del volumen de leche	Estimación para μ'_s (cm ⁻¹)	Estimación para μ_a (cm ⁻¹)
6	5	<0.015
12	10	<0.015
25	18	<0.015
50	30	<0.015
100	46	<0.015

Tabla 1. Estimación de μ'_s y μ_a para la leche

Basados en mediciones de la transmitancia total, la reflectancia difusa, y transmitancia colimada, las propiedades ópticas de la leche no diluida (3.5 % de grasa) fue obtenida sobre el rango de 700-1100 nm.⁷³ El índice de refracción de la leche en 650 nm. se encontró de $n = 1.36$. Datos experimentales fueron procesados usando ambos, un método inverso δ -Eddington inverso (IDE), y el método Monte Carlo (MCI) inverso combinado con una aproximación de ángulo pequeño (AAP) de la teoría de transferencia radiativa. El resultado para 880 nm se presenta en la tabla 2.

En una longitud de onda de 700 nm las propiedades de esparcimiento de la leche obtenidas por Yaroslavsky et al.²² están cerca de las estimaciones dadas por Wabnitz et al.²¹

Espesor de la muestra(mm)	μ_a (cm ⁻¹)		μ_s (cm ⁻¹)		g	
	DEI	MCI+AAP	DEI	MCI+AAP	DEI	MCI+AAP
0.1	7.86	0.93	140.2	140.3	0.7222	0.831
0.2	4.75	0.95	127.2	129.2	0.736	0.800
0.5	1.88	0.69	128.2	129.5	0.765	0.766

Tabla 2 Propiedades ópticas de leche sin diluir.²²

2.6 Preparación de un “phantom” para un medio que absorbe la luz

La absorción de la luz por tejido es simulada en “phantoms” reproduciendo el valor del coeficiente de absorción, μ_a . En muchos casos, cuando se emplean los “phantoms”, es suficiente con tomar en cuenta la propagación de la luz en una longitud de onda. Esto incrementa la variedad de colorantes que pueden ser considerados como candidatos para su uso en “phantoms”. Tales colorantes deben tener una absorbancia notable en la longitud de onda de interés y ser soluble en el material base. En adición, los colorantes deben cubrir los requerimientos de estabilidad, seguridad, y compatibilidad con los componentes del “phantom”. La espectrometría es una técnica convencional para la caracterización aislada de colorantes que usan los “phantoms”. La absorción específica de los colorantes disueltos en un medio anfitrión es medida a una longitud de onda dada. Estos datos son usados para predecir la propiedades de absorción de la luz en un “phantom” turbio cargado con estos colorantes.

Referencias

1. F. P. Bolin, L. E. Press, R. C. Taylor, and R. J. Ference, "Refractive index of some mammalian tissue using a fiber optic cladding method," *Appl. Opt.* Vol. "8, pp. 2297-2301 (1989).
2. G. Beck, N. Akgun, A. Ruck, and R. Stainer, "Design and characterization of a tissue phantom system for optical diagnostics," *Laser Med. Sci.* No.13, pp.160-171 (1998); G. Beck, N. Akgun, A. Ruck, and R. Steiner, "Developing optimized tissue phantom systems for optical biopsies," *Proc. SPIE* Vol. 3197, pp. 76-85 (1997).
3. G. Wagnieres, S. Cheng, M. Zellweger, N. Utke, D. Braichotte, J. Ballini, and H. Bergh, "An optical phantom with tissue-like properties in the visible for use in PDT and fluorescence spectroscopy," *Phys. Med Biol.* Vol. 42, pp. 1415-1426 (1997).
4. S. Chernova, A. Pravdin, Y. Sinichkin, V. Kochubey, V. Tuchin, and S. Vari, "Correlation of fluorescence and reflectance spectra of tissue phantoms with their structure and composition," *Proc. SPIE* Vol. 3598, pp. 294-300 (1999); S. Chernova, O. Kasimov, L. Kuznetsova, T. Moskalenko, and A. B. Pravdin, "Ex vivo and phantom fluorescence spectra of human cervical tissue," *Proc. SPIE* Vol. 4001, pp. 290-298 (2000); S. Chernova, A. Pravdin, Y. Sinichkin, V. Tuchin, and S. Vari, "Layered gel-based phantoms mimicking fluorescence of cervical tissue," *Proc. OWLS V*, pp. 301-306 (2000).
5. J. Linford, S. Shalev, J. Bews, R. Brown, and H. Schipper, "Development of a tissue-equivalent phantom for diaphanography," *Med. Phys.* Vol. 13, pp. 869-875 (1986).
6. M. Kohl, M. Cope, M. Essenpeis, and D. Bocker, "Influence of glucose concentration on light scattering in tissue simulating phantoms," *Opt. Lett.* Vol. 19, no. 24, pp. 2170-2172 (1994); M. Kohl, M. Cope, and M. Essenpeis, "The influence of glucose concentration upon the transport of light in tissue-simulating phantoms", *Phys. Med. Biol.* Vol. 40, pp. 1267-1287 (1995).
7. A. Awata, Y. Kato, and K Shimizu, "Imaging of absorption distribution in diffuse medium using backscattered light," *OSA TOPS* Vol. 21, Advances in Optical Imaging and Photon Migration, pp. 133-137 (1998).
8. A. Kienle, T. Glanzmann, G. Wagnieres, and H. Bergh, "Investigation of two-layered turbid media with time-resolved reflectance," *Appl. Opt.* 37, no 28, pp. 6852-6862 (1998).
9. A. Hielscher, H. Liu, B. Chance, F. Tittel, and S. Jacques, "Time-resolved photon emission from layered turbid media," *Appl. Opt.* Vol. 35, no 4, pp. 719-728 (1996).
10. R. Esenaliev, A. Karabutov, F. Tittel, B. Fornage, S. Thomsen, C. Stelling, and A. Oravsky, "Laser optoacoustic imaging for breast cancer diagnostic: limit of detection and comparison with X- ray and ultrasound imaging," *Proc. SPIE* Vol. 2979, pp. 71-82 (1997).
11. S. Prahl, I. Vitkin, U. Bruggemann, B. Wilson, and R. Anderson, "Determination of optical properties of turbid media using pulsed photothermal radiometry," *Phys. Med Biol.* Vol. 37, no. 6, pp. 1203-1217 (1992).
12. U. Sathyam and S. Prahl, "Limitations in measurement of subsurface temperatures using pulsed photothermal radiometry," *J. Biomed. Opt.* Vol. 2, no. 3, pp. 251-261 (1997).
13. W. Steenbergen and F. Mul, "Application of a novel laser Doppler tester including a sustainable tissue phantom," *Proc. SPIE* Vol. 3252, pp. 14-25 (1998).

14. S. Chernova, A. Pravdin, and V. Tuchin, "On polarized collimated transmittance of tissue-like phantom," *Proc. SPIE* Vol. 2982, pp. 6-17 (1997).
15. R. Cubeddu, A. Pifferi, P. Taroni, A. Torricelli, and G. Valentín, "Time resolved imaging on realistic tissue phantom: μ_s and μ_a images versus time integrated images," *Appl. Opt.* Vol. 35, no 22, pp.4533-4540(1996).
16. Y. Tsuchiya, Y. Ueda, H. Zhang, Y. Yamashita, M. Oda, and T. Urakami, "Analytical expressions for determining the concentrations of absorber in turbid media by time-gating measurements," *OSA TOPS* Vol. 21, *Advances in Optical Imaging and Photon Migration*, pp. 67-72 (1998).
17. S. Schilders, X. Gan, and M. Gu, "Resolution improvement in microscopic imaging through turbid media based on differential polarization gating," *Appl. Opt.* Vol. 37, no.19, pp. 4300-4302 (1998).
18. T. Farrell, R. Hawkes, M. Patterson, and B. Wilson, "Modeling of photosensitizer fluorescence emission and photobleaching for photodynamic therapy dosimetry," *Appl. Opt.* Vol. 37, no. 31, pp. 7168-7183 (1998).
19. R. Bays, G. Wagnieres, R. Dimitri, et al., "Three-dimensional optical phantom and its application in photodynamic therapy," *Lasers Surg. Med.* Vol. 21, pp. 227-234(1997).
20. R. Graaf, J. G. Aarnoudse, J. R. Zijp, et al., "Reduced light scattering properties for mixtures of spherical particles: a simple approximation derived from Mie calculations," *Appl. Opt.* Vol. 31, pp. 1370-1376(1992).
21. H. Wabnitz, R. Willenbrock, J. Neukammer, U. Sukowski, and H. Rinneberg, "Spatial resolution in photon diffusion imaging from measurements of time resolved transmittance," *Proc. SPIE* Vol. 1888, pp. 48-61 (1993).
22. I. Yaroslavsky, A. Yaroslavsky, T. Goldbach, and H. J. Schwarzmair, "Inverse hybrid technique for determining the optical properties of turbid media from integrating-sphere measurements," *Appl Opt.* Vol.35, no. 34, pp. 6797-6809 (1996).

3. Técnicas para la obtención de imágenes por tras iluminación.

3.1 Introducción

El contenido de proteínas, hemoglobina y agua básicamente determinan las propiedades de absorción en los tejidos vivos.¹ El agua absorbe en la región del UV profundo. La absorción de la sangre es fuerte en a través del rango del visible hasta los 600 nm, de longitud de onda, arriba de la cual la absorción decrece drásticamente. La absorción de las proteínas también decrece con el aumento de la longitud de onda, haciendo la región del rojo e infrarrojo adecuada para penetración de la luz atreves del tejido. De cualquier forma, en alrededor de 1.3 μm el agua comienza a absorber fuertemente, cerrando de nuevo la ventana para transmisión óptica.

En el infrarrojo cercano con una mínima absorción del tejido, el esparcimiento de la luz contra células y organelos causa una atenuación mucho más importante que la absorción, este fuerte esparcimiento es la causa de las dificultades en obtener imágenes bien definidas a través de los tejidos. Dos geometrías básicas para la investigación del la migración de los fotones en los tejidos se muestran en la Fig. 1. La luz es transmitida por el tejido en el punto A, emergiendo del tejido es recibido en el punto B. A causa del esparcimiento es posible obtener una señal en el punto B también en el caso mostrado en la figura de la derecha (b). En principio, el punto B puede fundirse con el punto A, el cual es el caso frecuentemente en mediciones de la sangre, usando medición de flujo Doppler.² Para el caso de iluminación por tejido (Fig. 1a) una componente de luz no esparcida es

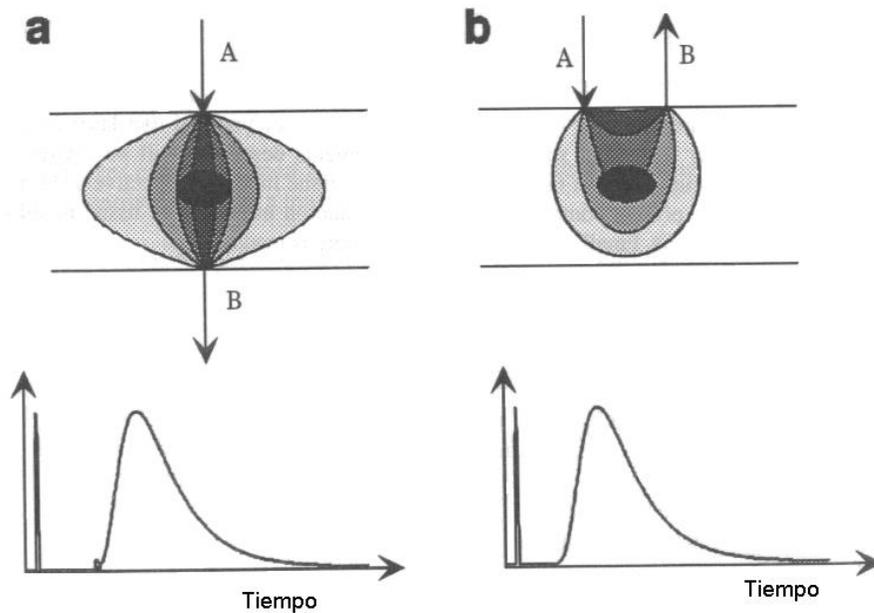


Fig. 1 Geometrías para mediciones en un medio turbio a) Tras iluminado b) Retroesparcimiento

esperada para el caso de una muestra de tejido lo suficientemente delgada. Para muestras gruesas no se espera la componente no esparcida, y el caso mostrado en la Fig. 1a se parece más al caso mostrado en la Fig. 1b para el caso de muestras fuertemente esparcidas. La diferencia entre la componentes no esparcida y la esparcida puede ilustrarse mas claramente para el caso de iluminación del tejido por un pulso láser corto (ps) y detección resuelta en tiempo de los fotones que emergen del tejido, esto se muestra en el diagrama incluido en la parte inferior de la Fig.1. Después de la inyección del pulso en el tejido en un tiempo $t = 0$ una componente no esparcida va llegar al lado opuesto del tejido con un retraso de tiempo $\delta t = d/v$. Con la velocidad de propagación de la luz igual a $v = c/n$ el tiempo de retraso para una sección de tejido con grosor $d = 2$ cm e índice de refracción $n = 1.5$ (agua) es 100 ps. Después de esta componente no esparcida (balística) luz esparcida y múltiplemente esparcida es recibida en una distribución del tiempo de llegada muy ancha, incluyendo los rechazos correspondientes a la medida completa de la distancia de viaje en el tejido.

La componente no esparcida se caracteriza no solo por llegar antes sino también por tener las mismas propiedades de coherencia que el pulso original. La idea general para mejorar las imágenes obtenidas a través de los tejidos, es usar solo esta primera componente, rechazando toda la luz que llega después que contiene poca información geométrica.

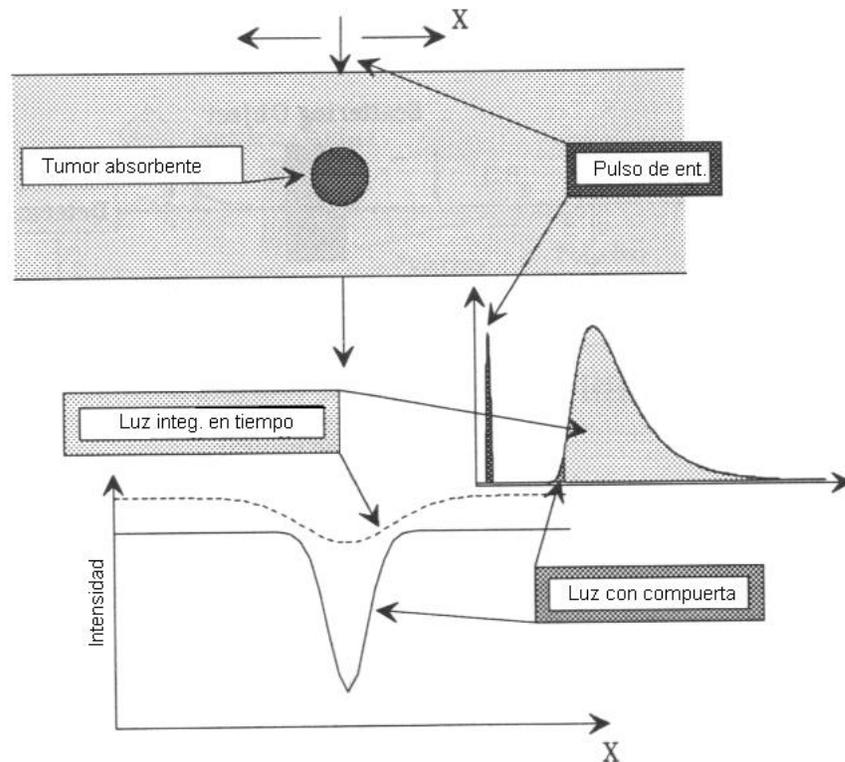


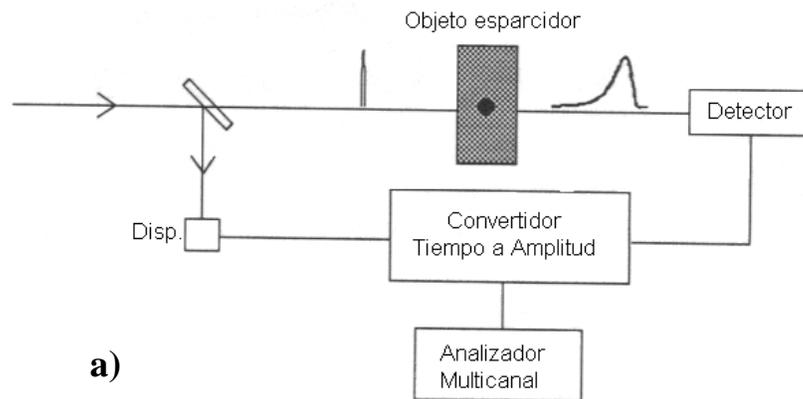
Fig. 2 Se puede mejorar la resolución espacial seleccionando la luz que entra primero por medio de compuertas electrónicas.

Para muestras de tejido gruesas, esta componente que llega primero es tan fuertemente atenuada que no es detectada. (Para un coeficiente de esparcimiento típico $\mu_s = 10 \text{ mm}^{-1}$ y un grosor de tejido de 50 mm, obtenemos una atenuación de $e^{-500} = 10^{-218}$). Todavía se puede obtener un mejoramiento en la imagen usando compuertas electrónicas en

la componente que llega primero, minimizando la luz esparcida. Obviamente un objeto opaco en un medio esparcidor no va producir sombras bien definidas, pero el uso de la compuerta mejora el objeto. Este concepto se muestra en la figura 2.

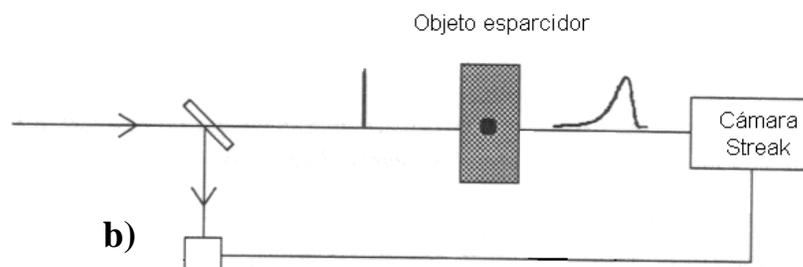
Los primeros fotones detectados llegan con un tiempo de retraso correspondiente que corresponde a una línea recta entre los puntos A y B en la Fig. 1. Los fotones que penetran más en el tejido llegan después. Combinando información de diferentes pares de puntos transmitidos y recibidos puede obtenerse información tridimensional, por medio de técnicas

Conteo de un fotón correlacionado en el tiempo



a)

Detección con cámara Streak



b)

Fig. 3 Técnicas que utilizan compuertas electrónicas, para seleccionar parte del pulso transmitido.

tomográficas.

En un gran número de técnicas de obtención de imágenes a través del tejido, solo el tiempo de llegada de los fotones, que emergen de la muestra, es utilizado, mientras la fase del campo electromagnético de la luz es ignorado. A estas técnicas se les puede llamar incoherentes. En una clase de estas técnicas se utiliza la distribución resuelta en el tiempo, de la llegada de los fotones, siguiendo la inyección de un pulso en el tejido. Esta se realiza técnicamente de diferentes maneras, como es ilustrado en las Figs. 3 y 4.

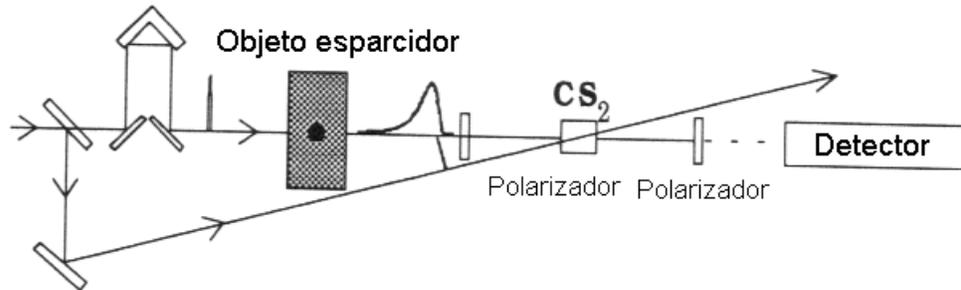
3.2 Técnicas incoherentes

- Conteo de un solo fotón correlacionado en el tiempo. (Fig. 3a) Aquí un láser con razón de alta repetición en picosegundos, es usado como transmisor, y el primer fotón emergente es detectado. El tiempo de retraso es medido con un convertidor tiempo a amplitud. Manteniendo la probabilidad de detección de un fotón baja, aún fotones que lleguen tarde pueden ser detectados con una probabilidad sin polarizar por el esquema de detección electrónico. Un histograma de los tiempos de llegada es acumulado usando un gran número de pulsos de baja energía. El tiempo de resolución esta limitado a 50 ps.
- Detección con cámara Streak. (Fig. 3b) Usando pulsos más energéticos de láser con razón de baja repetición de picosegundos, una cámara Streak se utiliza para grabar el transitorio emergente resuelto en tiempo. Se puede obtener con esta tecnología un tiempo de resolución por debajo de 1 ps. Esta tecnología a sido usada por Hebden et

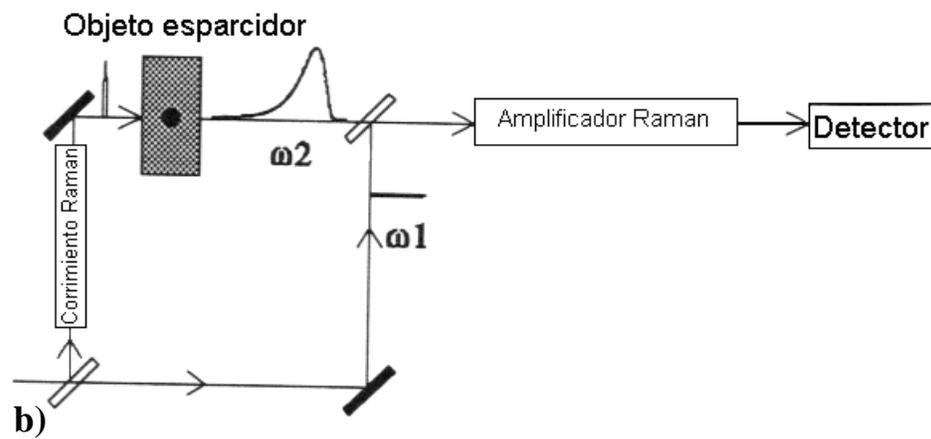
al.³ y por Alfano et al.⁴ Utilizando una cámara Streak en modo sincronizado, se puede usar inclusive con una fuente de alta repetición con pulsos de baja energía.

- Utilizando un obturador de efecto Kerr como compuerta.(Fig. 5a) La selección de la ventana de la primera parte del pulso en llegar es lograda por una compuerta óptica Kerr, colocada donde emerge el haz proveniente del tejido. Un láser energético es utilizado en este experimento donde parte del pulso es transmitido en el tejido y parte es usado para abrir el obturador utilizando el efecto óptico Kerr. Ya que el ancho de la compuerta esta determinado solo por la longitud del pulso láser, se pueden lograr tiempos de la compuerta debajo de picosegundos. Esta técnica a sido usada por Wang et al.⁵

Compuerta óptica Kerr



a) **Amplificación Raman estimulada**



Correlación cruzada de segundo armónico

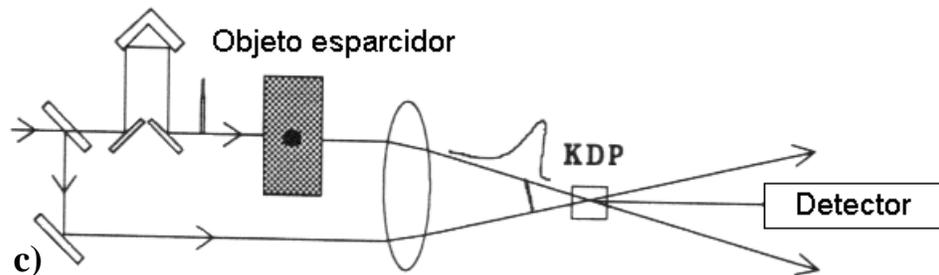


Fig. 4 Técnicas que utilizan fenómenos ópticos no lineales, para recortar el pulso emergente.

- Compuerta por amplificador Raman.(Fig.4b) Esta técnica también utiliza pulsos láser energéticos, pero el tiempo de corte del intervalo para una detección adecuada

se logra de diferente manera. Una onda Stokes generada en un esparcimiento estimulado Raman en un gas es utilizado para probar el tejido. La luz emergente es amplificada en un amplificador Raman, el cual es bombeado, por un pulso láser ultracorto con el tiempo de retraso adecuado para cortar el pulso en la parte que casi no sufre esparcimiento. Esta técnica ha sido desarrollada por Duncan et al.⁶

- Doble frecuencia correlacionada en el tiempo. (Fig. 4c) Las dos últimas técnicas mencionadas arriba usan adecuadamente una parte retardada del pulso de luz para obtener una compuerta de obturación completamente óptica. De modo similar una doble frecuencia correlacionada en el tiempo, como es frecuentemente usada en autocorreladores para caracterización de pulsos láser, puede ser utilizada como compuerta óptica en fotones de señal. Esta fue usada por Fujimoto et al.⁷ para examinar el cristalino del ojo usando técnicas con picosegundos, aplicándola en la medición de distancias muy pequeñas. Esta técnica se ha extendido al estudio de medios con un alto esparcimiento.⁸

El mismo tipo de información puede ser obtenido con el método de desplazamiento de fase usando una fuente láser modulada (sinusoidal) y utilizando el desplazamiento en fase y reducción del contraste de modulación de la luz detectada. La relación entre las estrategias de medición resueltas en el tiempo y las de desplazamiento de fase se ilustra mejor por el caso bien conocido de medición del tiempo de vida del estado excitado en física atómica y molecular.⁹ Siguiendo el decaimiento temporal por excitación de un pulso corto $I(t)$ de un estado excitado puede ser expresado como:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (3.1)$$

donde I_0 es la amplitud y τ es el tiempo de vida del estado excitado. Para evaluar correctamente el valor del tiempo de vida de la curva de decaimiento utilizando un ajuste exponencial, es importante utilizar solo la parte temporal de la curva para la cual el pulso de excitación (teniendo un ancho finito) ha terminado completamente. Para tiempos de vida cortos τ esto no es siempre posible.

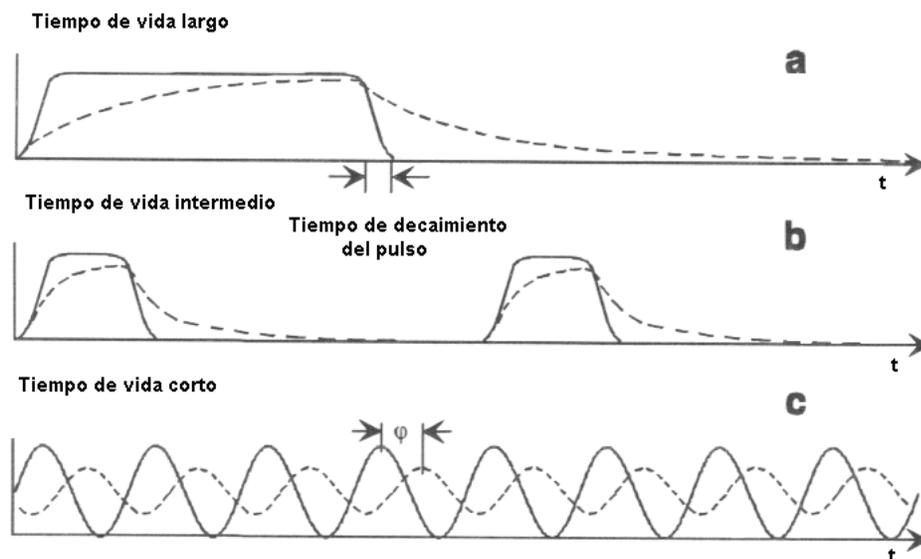


Fig.5 Ilustración de decaimiento resuelto en el tiempo y mediciones de corrimiento de fase. La línea sólida indica la luz de excitación y las curvas punteadas la fluorescencia. En el caso a) se puede ajustar una exponencial al decaimiento en la respuesta temporal después de que el pulso ha terminado. En el caso b) la curva de decaimiento debe ser deconvolucionada con la forma del pulso determinado experimentalmente. En el caso c) una fuerte deconvolución se puede lograr, pero los datos son expresados en una forma mejor en términos de un factor de pérdida de contraste y un corrimiento en fase.

Entonces es necesario usar una deconvolución de la curva temporal detectada con el pulso separado de excitación. Básicamente esto es hecho dividiendo el pulso en intervalos cortos de tiempo cada uno induciendo un decaimiento temporal de cierta intensidad, y añadiendo estas contribuciones desplazadas temporalmente con un valor

de tiempo de vida τ elegido para ajustarse a la curva experimental. Si los pulsos de excitación son transmitidos con intervalos de tiempo cada vez más cortos las curvas de decaimiento (convolucionado) comienzan a fundirse unas con otras dando un incremento a la modulación solo en la fluorescencia como se ilustra en la Fig. 5.¹⁰ Por análisis de Fourier se puede identificar una modulación senoidal fundamental. Aún el caso más puro es el primero con una modulación senoidal fundamental de la fuente de luz.

$$I_{exc}(t) = I_0 [1 + A \text{sen}(\omega t)] \quad (3.2)$$

Tratando este caso del mismo modo que arriba, con pulsos de modulación discreta requiriendo una fuerte deconvolución la curva de intensidad de fluorescencia correspondiente $I(t)$ se puede calcular:

$$I(t) = BI_0 \left[1 + \frac{A}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} \text{sen}(\omega t + \phi) \right] \quad (3.3)$$

con

$$\tan \phi = \omega \tau \quad (3.3)$$

Un factor de pérdida de contraste $1/\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}$ y un corrimiento en fase ϕ se obtienen usando este método, así llamado *método de corrimiento de fase*. Notamos, considerando este caso como uno de excitación de pulso discreto o necesitando una deconvolución extensiva para obtener el tiempo de decaimiento τ o uno que exprese el resultado en términos de pérdida de contraste y corrimiento de fase, es un asunto de sabor y lingüística. En el análisis de las curvas de decaimiento toda la curva es usada para el ajuste, no solo, por ejemplo el tiempo para una caída de 1/e de la intensidad. De

la misma forma, efectuando la medición del corrimiento de fase para muchas diferentes frecuencias de modulación ω , más datos son obtenidos, que solo un simple número para el ajuste de un tiempo de vida de estado excitado.

Nada tan cercano a esta relación entre el método de decaimiento resuelto en tiempo y el método de corrimiento de fase para el caso de mediciones del decaimiento de fluorescencia es tan natural que en estudios de migración de fotones en tejidos el método de corrimiento de fase debe producir la misma información como la espectroscopia pura resuelta en el tiempo. Este método de corrimiento de fase ha sido utilizado extensivamente para pruebas en tejidos.¹¹⁻¹³ Modulando un intensificador de imagen con placa de microcanal a una frecuencia muy cercana a la frecuencia de modulación del transmisor se obtiene una información muy interesante en el batido de baja frecuencia entre la onda modulada y la modulación del detector (heterodino). El batido de intensidad lenta puede ser recogido por técnicas estándar con video cámaras y se obtiene una imagen directa de toda el área del intensificador. Una extensión interesante de esta técnica es usar dos fuentes moduladas separadas espacialmente y observar la interferencia de las ondas difusas en el tejido para mejorar la resolución espacial de estructuras escondidas.

3.3 Técnicas coherentes

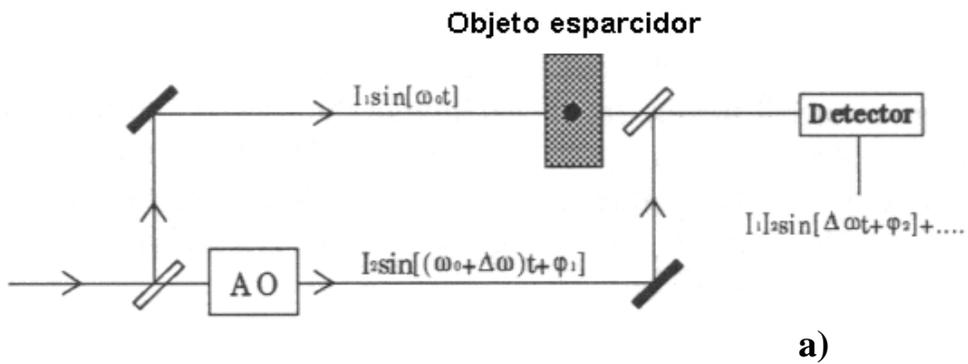
En esta clase de técnicas se utiliza la componente no esparcida (débil) de la luz que emerge del tejido. Utilizar las propiedades de unicidad de la coherencia de la fuente para identificar la parte de la luz que transporta información es extremadamente

atractivo, también porque puede usarse una fuente de onda continua (CW). Dos variedades de técnicas coherentes se muestran en la Fig. 6.

- Detección heterodina. En esta técnica introducida por Toida et al.¹⁴, un haz láser de un solo modo es transmitido a través del tejido y un haz de referencia del mismo láser es tomado alrededor de la muestra para interferir colinealmente en el detector con el haz emergiendo del tejido. La luz no esparcida retiene su relación de fase con el haz de referencia y la amplitud del batido de la diferencia de frecuencia en el receptor heterodino es proporcional a la intensidad de la luz no esparcida.
- Holografía de luz en vuelo. El pionero en la técnica de holografía de luz en vuelo fue Abramsson et al.,¹⁵ y ha sido aplicada en el caso de obtención de imágenes de los tejidos por Chen et al.¹⁶ La formación de un holograma requiere de luz coherente, lo cual significa que solo la parte de la luz no esparcida que emerge del tejido puede interactuar con el rayo de referencia para generar un holograma. Obviamente, para la componente débil de luz no esparcida la placa va a ser oscurecida por la abrumadora luz incoherente de la fuente de onda continua (CW). Mediante el uso de una fuente pulsada la variedad de luz en vuelo puede ser selectivamente seleccionada en la parte de la componente que llega sin esparcimiento usando el apropiado tiempo de retardo para el rayo de referencia. La principal y más fuerte limitación de las técnicas coherentes es que debe haber una componente no esparcida emergiendo del tejido, y para porciones de espesores grandes tal componente es muy pequeña o indetectable. Se puede notar que, aunque la información de coherencia desaparece, puede ser ventajoso detectar sólo la luz

que emerge en la dirección de propagación inicial, por filtrado espacial (visión de túnel). Tales fotones tienen una mayor probabilidad de haber sufrido menos eventos de esparcimiento que los otros y por lo tanto retener más información al pasar a través de un medio turbio.

Detección Heterodina



Holografía de luz en vuelo

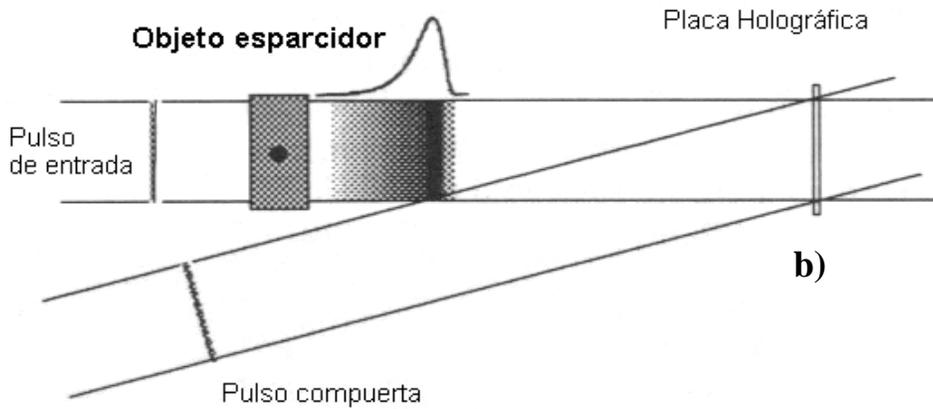


Fig. 6 Técnicas basadas en la coherencia del haz

3.4 Reflectometría en el dominio espacial

Para incrementar la resolución espacial de la técnica de doble frecuencia correlacionada en el tiempo discutida arriba, aún pulsos ópticos mas cortos deben ser usados en un arreglo experimental de reflectometría en el dominio del tiempo, el cual recuerda mucho a un interferómetro de Michelson. Pulsos mas cortos significan una distribución espectral mas ancha en el espectro de Fourier. De cualquier manera, en un interferómetro de luz blanca, la interferencia es obtenida solo por idénticos caminos ópticos en los brazos de referencia y de señal del interferómetro. Swanson et al.,¹⁷ se dieron cuenta, que información seleccionada retroesparcida de una distancia en particular puede ser obtenida sin uso de ningún pulso corto para medir distancias. En su lugar, puede utilizarse la señal interferométrica sin diferencia de camino óptico, ya que su calidad se incrementa, entre más ancha es la distribución espectral de la fuente de luz (Reflectometría en el dominio espacial). Entonces un diodo emitiendo en onda continua (CW) es una fuente de luz adecuada. La técnica a sido utilizada en aplicaciones oftalmológicas en estructuras con muy poco esparcimiento, pero debe ser útil en medios turbios también. En esta técnica la direccionalidad especifica de los fotones seleccionados es también usada como en la técnica de detección heterodina. De cualquier manera, la reflectometría en el dominio espacial, puede sufrir de un ruido abrumador proveniente de la luz esparcida en múltiples ocasiones, que no es eliminada en estas técnicas.

Referencias

1. J.-L. Boulnois, "Photophysical processes in laser-tissue interactions," in: *Laser applications in cardiovascular diseases*, R. Ginsberg (ed), Futura, New York, 1987.
2. P.A. Öberg, "Laser-Doppler flowmetry," *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **18**, 125-163 (1990).
3. J. C. Hebden, R. A. Kruger and K. S. Wong, "Time resolved imaging through a highly scattering medium", *Appl. Opt.* **30**, 788-794 (1991).
4. R. Alfano, P-P Ho and K-M Yoo, "Photons for prompt tumor detection", *Phys. World* **5**, 37-40 (1992).
5. L. Wang, Y. Liu, P.P. Ho and R.R. Alfano, "Ballistic imaging of biomedical samples using picosecond optical Kerr gate," in *Time Resolved Spectroscopy and Imaging of Tissue*, B. Chance, ed., SPIE vol. 1431, 97-101 (1991).
6. M. D. Duncan, R. Mahon, L.L. Tankersley and R. Reintjes, "Time-gated imaging through scattering media using stimulated Raman amplification," *Opt. Lett.* **16**, 1868-1870 (1991).
7. J.G. Fujimoto, S. De Silvestri and E.P. Ippen, "Femtosecond optical ranging in biological systems," *Opt. Lett.* **11**, 150-152 (1986).
8. K. M. Yoo, Q. Xing and R. R. Alfano, "imaging objects hidden in highly scattering media using femtosecond second-harmonic-generation cross-correlation time gating," *Opt. Lett.* **16**, 1019-1021 (1991).
9. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, (Plenum, New York, 1983).
10. G. Jönsson, C. Levinson and S. Svanberg, "Natural radiative lifetimes and Stark-shift parameters in the $4p^2$ configuration in CaI," *Phys. Scripta* **30**, 65-69 (1984).
11. J. Fishkin, E. Gratton, M. J. van de Ven and W. W. Mantulin, "Diffusion of intensity modulated near-infrared light in turbid media," in *Time-Resolved Spectroscopy and Imaging of Tissue*, B. Chance, ed., SPIE vol. 1431, 122-135 (1991).
12. S. L. Jacques, "principles of phase-resolved optical instruments," in *Future Trends in Biomedical Applications of Laser*, L. O. Svaasand, ed., SPIE vol. 1525, 143-153 (1991).
13. M. S. Patterson, J. D. Moulton, B. C. Wilson, K. W. Berndt and J. R. Lakowicz, "Frequency-domain reflectance for the determination of the scattering and absorption properties of tissue," *Appl. Opt.* **30**, 4474-4476 (1991).

14. M. Toida, T. Ichimura and H. Inaba, "The first demonstration of laser computed tomography archived by coherent detection amaging method for biomedical applications," *IEICE Trans.* **E 74**, 1692-1694 (1991).
15. K. G. Spears, J. Serafin, N. H. Abramson, X. Zhu and H. Bjelkhagen, "Chrono-coherent imaging for medicine," *IEEE Tans. Biomed. Eng.* **36**, 1210-1221 (1989).
16. H. Chen, Y. Chen, D. Dilworth, E. Leith, J. Lopez and J. Valdmanis, "Two Dimensional imaging through diffusing media using 150-fs gated electronic holography techniques," *Opt. Lett.* **16**, 487-489 (1991).
17. E. A. Swanson, D. Huang, M. R. Hee, J. G. Fujimoto, C. P. Lin and C. A. Puliafito, "High speed optical coherence domain reflectometry," *Opt. Lett.* **17**, 151-153 (1992).

4. Mediciones ópticas ultrarrápidas.

4.1 Introducción

El concepto de usar alta velocidad con compuertas ópticas para obtener imágenes en sistemas esparcidores como los tejidos biológicos fue propuesto primero por M. Duguay hace 30 años.¹⁻³ Duguay demostró un obturador Kerr ultrarrápido para fotografiar la luz en vuelo. El obturador Kerr puede lograr resoluciones de picosegundos o femtosegundos y opera utilizando un pulso intenso de luz ultracorto para inducir birrefringencia (efecto Kerr) en un medio óptico puesto entre polarizadores cruzados. Duguay reconoció los límites de esparcimiento óptico para obtener imágenes en tejidos biológicos y que un obturador de alta velocidad podía utilizarse para eliminar la luz esparcida no requerida, y detectar la luz proveniente de las estructuras internas. Esta tecnología podía ver a través de los tejidos y formar imágenes con un método no invasivo de las estructuras biológicas.

La principal desventaja de un obturador Kerr es que requiere pulsos láser de alta intensidad para inducir el efecto Kerr y operar como obturador. Una aproximación alternativa al obturador de alta velocidad es el uso de la generación del segundo armónico o conversión paramétrica. El objetivo o espécimen del que se obtiene la imagen es iluminado con pulsos cortos y la luz proveniente es por parámetros convertida con un pulso de referencia en un cristal óptico no lineal.^{4,5} El pulso de referencia es retrasado por una variable de tiempo τ , de el pulso de la señal, y el proceso no lineal crea una compuerta de alta velocidad óptica. Si $I_s(t)$ es la señal y $I_r(t)$ es el pulso de referencia la función de respuesta $S(\tau)$ esta dada por

$$S(\tau) \sim \int_{-\infty}^{\infty} I_s(t)I_r(t-\tau)dt \quad (4.1)$$

Conmutaciones de óptica no lineal miden el tiempo de retraso y la intensidad de una señal óptica de alta velocidad. La resolución en tiempo esta determinada por la duración del pulso, y la sensibilidad esta determinada por la eficiencia de conversión del proceso no lineal. Mediciones ópticas de distancias por tiempo de vuelo fueron demostradas primero en tejidos biológicos para medir el grosor de al cornea y la profundidad de la capa córnea y epidermis.⁶ Se pueden lograr rangos dinámicos de 10^6 o mayores. La correlación transversal no lineal no requiere pulsos de tan alta intensidad como los del obturador Kerr pero requiere aún el uso de pulsos cortos. Es importante notar que esta técnica detecta intensidad (en lugar del campo eléctrico) de la luz retroesparciada.

La detección interferométrica vence muchas de las limitaciones de las técnicas con conmutación no lineal y pueden medir el tiempo de retraso o la luz con un alto rango dinámico y una alta sensibilidad. Estas técnicas son análogos a la detección óptica coherente en comunicaciones ópticas (en contraste a la detección directa). OCT (por sus siglas en inglés) esta basada en interferometría de baja coherencia o interferometría de luz blanca, que fue descrita primeramente por Isaac Newton. Mas recientemente a sido utilizada para caracterizar ecos ópticos y retroesparcimiento en fibras ópticas y dispositivos guías de onda.⁷⁻⁹ La primera aplicación de interferometría de baja coherencia fue en biometría oftalmológica para medir la longitud del ojo.¹⁰ desde entonces, versiones relacionadas de esta técnica han sido desarrolladas para mediciones biométricas no invasivas de alta precisión y alta resolución^{11,12}Un interferómetro de haz dual fue usado para efectuar las primeras mediciones en vivo de la longitud axial del ojo en

oftalmología.¹³ Mediciones de alta resolución del grosor de la cornea, en vivo fueron demostradas, por el uso de interferometría de baja coherencia.¹⁴

Interferometría de baja coherencia mide el campo eléctrico de el haz en lugar de su intensidad. En el vacío, la velocidad de la luz es $c = 3 \times 10^8$ m/s, por otro lado en el agua, tejidos y otros materiales, la velocidad de propagación de la luz es reducida de su velocidad en el vacío de acuerdo al índice de refracción n de el medio, $v = c/n$. La forma funcional del campo eléctrico en una onda de luz es

$$E_i(t) = E_i \cos\left(2\pi\nu t - \frac{2\pi}{\lambda} z\right) \quad (4.2)$$

Cuando dos haces de luz son combinados sus campos, en lugar de sus intensidades, se suman y producen interferencia. La figura 1 muestra un diagrama esquemático de un interferómetro simple Mach-Zehnder.

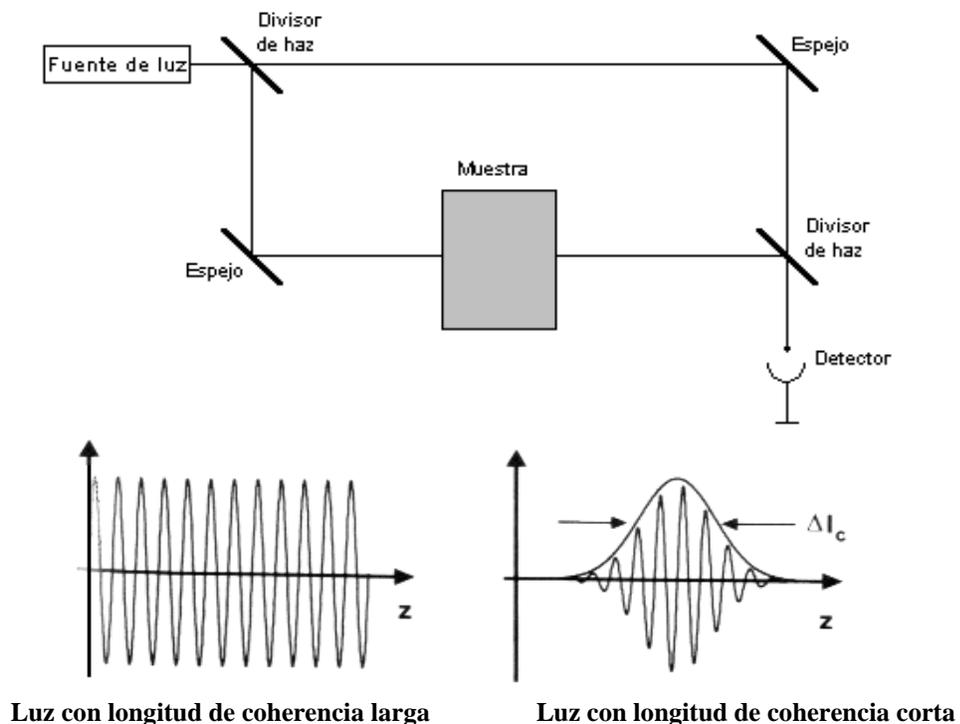


Fig. 1 Tomografía óptica coherente esta basada en interferometría. La señal de referencia es correlacionada con le luz proveniente de la muestra.

La onda óptica incidente es dirigida a un divisor de haz o espejo parcial el cual lo divide en un haz de referencia y un haz que pasa por la muestra, en cada brazo del interferómetro el haz de referencia $E_r(t)$ y el haz de señal $E_s(t)$, después de atravesar el espécimen, son reflejados y se recombinan e interfieren en el segundo divisor de haz. La salida es la suma de los campos electromagnéticos del haz de referencia y el haz de la señal proveniente del tejido:

$$E_0(t) \approx E_r(t) + E_s(t) \quad (4.3)$$

Un detector mide la intensidad del haz de salida, el cual es proporcional al cuadrado del campo electromagnético. Si la distancia que la luz viaja en la trayectoria de referencia es l_r y l_s es la distancia en la trayectoria que sigue el haz que pasa por la muestra, entonces la intensidad de la salida del interferómetro va oscilar como función de $\Delta l = l_r - l_s$:

$$I_0(t) \approx \frac{1}{4}|E_r|^2 + \frac{1}{4}|E_s|^2 + \frac{1}{2}E_s E_r \cos(2\frac{2\pi}{\lambda}\Delta l) \quad (4.4)$$

Al variar la distancia en alguno de los brazos, el camino óptico cambia y la interferencia ocurre. Si la luz es altamente coherente (angosto ancho de línea) o tiene una gran longitud de coherencia, entonces las oscilaciones se observaran por un amplio rango de longitudes relativas entre las distancias de los brazos de referencia y señal. Para aplicaciones en tomografía óptica coherente y mediciones ópticas, es necesario medir la distancia absoluta y las dimensiones de las estructuras dentro del material o tejido. En este caso, se usa una fuente de luz con longitud de coherencia corta. Una luz de baja coherencia puede pensarse como la superposición de campos electromagnéticos con discontinuidades

estadísticas en fase como función del tiempo. El campo está compuesto de diferentes frecuencias o longitudes de onda en lugar de una sola longitud de onda. La luz de baja coherencia puede caracterizarse por su longitud de coherencia (l_c). La longitud de coherencia es inversamente proporcional al ancho de banda. Cuando una luz de baja coherencia es utilizada en un interferómetro, el patrón de interferencia es observado solo cuando el camino óptico del brazo de referencia y del brazo de la señal se encuentran emparejados en el rango de la longitud de coherencia de la fuente de luz. Este fenómeno se muestra esquemáticamente en la figura 1. El interferómetro mide la autocorrelación del campo electromagnético de la luz. Para el propósito de obtener imágenes y medición de distancias, la longitud de coherencia de la luz determina la resolución con la cual la distancia óptica puede ser medida.

4.2 Límites de resolución de OCT

En la siguiente sección se describen los mecanismos que gobiernan el desempeño de la tomografía de coherencia óptica. Ya que la OCT está basada en la tecnología moderna de comunicaciones ópticas, su desempeño puede ser predicho utilizando teorías bien establecidas con gran exactitud.

En contraste con la microscopía convencional, en OCT el mecanismo que gobierna la resolución axial y transversal de la imagen son independientes. En OCT la resolución axial está determinada por la longitud de coherencia de la fuente de luz, y una alta resolución puede lograrse independientemente de las condiciones de enfoque del haz. La longitud de coherencia es el ancho espacial de la autocorrelación del campo producida

por el interferómetro. La envolvente de la auto correlación del campo es equivalente a la transformada de Fourier del espectro de potencia. Entonces el ancho de la función de auto correlación, o resolución axial es inversamente proporcional al ancho del espectro de potencia. Para una fuente con una distribución espectral gaussiana, la resolución axial Δz es

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi} \left(\frac{\lambda^2}{\Delta \lambda} \right) \quad (4.5)$$

donde Δz y $\Delta \lambda$ son el ancho total de la mitad del máximo (FWHM, por sus siglas en inglés) de la función de auto correlación y el espectro de potencia, respectivamente y λ es la longitud de onda central de la fuente. La resolución axial es inversamente proporcional al ancho de banda de la fuente de luz, entonces fuentes ópticas de un ancho de banda amplio se requieren para lograr una alta resolución axial.

La resolución transversal para OCT es la misma que para microscopía óptica convencional y esta determinada por las propiedades de enfoque del haz óptico. El tamaño de punto mínimo al cual un haz puede ser enfocado es inversamente proporcional a la apertura numérica de el ángulo de enfoque del haz. La resolución transversal es

$$\Delta x = \frac{4\lambda}{\pi} \left(\frac{f}{d} \right) \quad (4.6)$$

donde d es el tamaño del punto en el lente del objetivo y f es su distancia focal. Una resolución transversal alta se puede obtener utilizando una gran apertura numérica y enfocando el haz en un punto pequeño. En adición, la resolución transversal esta relacionada con la profundidad de foco o el parámetro confocal b , el cual es $2z_R$, dos veces la distancia de Rayleigh:

$$2z_R = \pi \Delta x^2 / 2\lambda \quad (4.7)$$

Entonces, un incremento en la resolución transversal produce un decrecimiento en la profundidad de foco, similar a lo que se produce en microscopia convencional.

La figura 2 muestra esquemáticamente la relación entre el tamaño del punto enfocado y la profundidad de campo para enfoque con un alta y baja apertura numérica. Las condiciones de enfoque definen dos casos límite para imágenes obtenidas con OCT. Típicamente, las imágenes con OCT se efectúan con un enfoque de baja apertura numérica, para tener una gran profundidad de campo, y una interferometría de baja coherencia se usa para obtener una alta resolución axial. En este límite el parámetro confocal es mayor que la longitud de coherencia, $b > \Delta z$. La resolución axial de la imagen es determinada por la longitud de coherencia y la resolución transversal por el tamaño del punto.

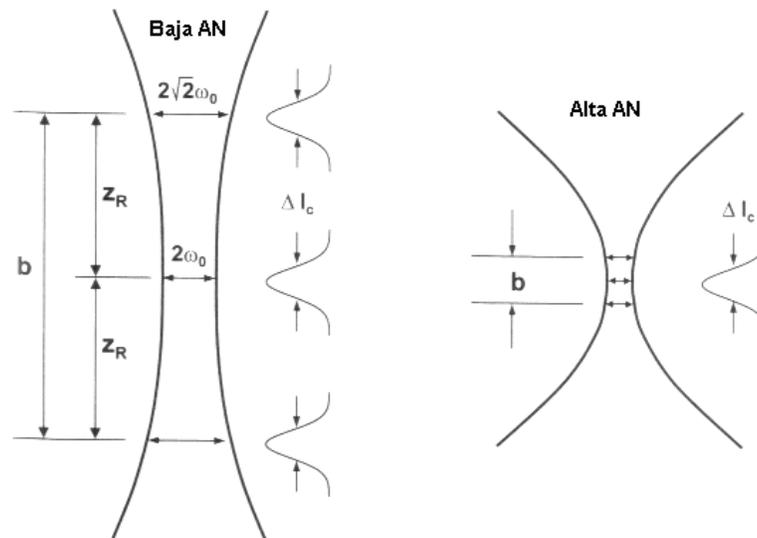


Fig. 2 Límites de enfoque de OCT con apertura numérica baja y alta. La mayoría de las imágenes en OCT se efectúan con una baja apertura numérica, donde el parámetro confocal es mucho mas grande que la longitud de coherencia.

En contraste con la microscopia convencional, este modo de operación logra una alta resolución axial independientemente de la apertura numérica disponible. Esta característica es muy poderosa particularmente para aplicaciones como imágenes de la retina en oftalmología o en imágenes basadas con catéteres-endoscopios donde la apertura numérica puede ser muy limitada. De cualquier manera, la operación con apertura numérica limitada produce una resolución transversal baja.

Recíprocamente, es posible enfocar con una alta apertura numérica y lograr una alta resolución transversal con un costo de una reducida profundidad de foco. Este modo de operación es típico para microscopia convencional o microscopia confocal. Dependiendo de la longitud de coherencia de la luz, la profundidad de campo, puede ser más corta que la longitud de coherencia, $b < \Delta z$. En este caso la profundidad de campo puede ser usada para diferenciar señales de diferentes profundidades. Este régimen de operación es referido como microscopia de coherencia óptica (OCM). Este modo de operación puede ser útil para obtener imágenes en sistemas esparcidos porque el efecto de conmutación coherente remueve las contribuciones esparcidas para enfrente y para atrás del plano focal más efectivamente que la conmutación confocal.

Aunque en OCT se puede lograr una alta resolución transversal, la profundidad de campo va a ser limitada. Para obtener imágenes sobre un rango de profundidades es necesario rastrear la profundidad de foco a lo largo con el rango axial que está siendo detectado.¹⁵ Alternativamente, es posible usar una técnica análoga al ultrasonido con barrido en modo C y obtener múltiples imágenes con diferentes zonas de foco y unir las en una sola para obtener una imagen con profundidad de campo extendida.¹⁶

4.3 Límites de sensibilidad para OCT

Con la tomografía óptica coherente se pueden obtener una alta sensibilidad de detección porquien la interferometría mide el campo en vez de la intensidad de la luz utilizando detección óptica heterodina. Este efecto puede ser visto en la ecuación (4.4) la cual describe la intensidad de la señal interferométrica de salida. El término oscilante interferométrico es el resultado del campo eléctrico de la señal (el cual puede ser muy débil) multiplicado por el campo eléctrico del haz de referencia. Ya que el haz de referencia tiene una gran amplitud, el campo eléctrico débil de la señal es multiplicado por el de referencia, por lo tanto incrementando la magnitud del término oscilante que es detectado por el sensor. El interferómetro produce entonces, una ganancia heterodina para señales ópticas débiles.

El desempeño de la razón señal a ruido puede ser calculado usando métodos bien establecidos de comunicaciones ópticas. La razón señal a ruido esta dada por la expresión

$$SNR = 10 \log(\eta P / 2h\nu NEB) \quad (4.8)$$

donde η es la eficiencia cuántica del detector, $h\nu$ es la energía del fotón, P es la potencia de la señal, y NEB es el ancho de banda del ruido equivalente del filtro electrónico utilizado para demodular la señal. Esta expresión implica que la razón señal a ruido se escala con la potencia detectada dividida por el ancho de banda de ruido equivalente de la detección. Esto significa que para más alta velocidad de adquisición de imágenes o más alta resolución de imágenes se requieren más altas potencias ópticas para una razón señal ruido dada. El desempeño de sistemas de tomografía óptica coherente varia ampliamente de acuerdo con su diseño y requerimientos de velocidad de adquisición de datos. De cualquier

manera, para mediciones típicas de parámetros, se pueden obtener sensibilidades que están en el rango de -90 a -100 dB, que corresponden a señales que están en el rango de 10^{-9} o 10^{-10} de potencia óptica incidente.

4.4 Profundidad de penetración

La sensibilidad de detección determina el desempeño de obtención de imágenes de la tomografía óptica coherente para diferentes aplicaciones. Es útil considerar a las imágenes OCT en dos casos límite: 1) imágenes en un medio con un esparcimiento muy débil y 2) imágenes en un medio con muy alto esparcimiento. Cuando OCT es efectuada en un medio con bajo esparcimiento, la profundidad de obtención de las imágenes no está muy limitada, porque hay muy poca atenuación del haz incidente. En lugar, la sensibilidad de la detección del OCT establece un límite en la señal más pequeña que puede ser detectada. Un ejemplo de esto es en aplicación de almacenaje de datos ópticos que codifican información usando reflexiones de pequeños cambios en índices de refracción.¹⁸ En esta aplicación es deseable utilizar un cambio en el índice tan pequeño como sea posible. Si una reflexión óptica es generada como resultado de un pequeño cambio en el índice δn , entonces la magnitud de la intensidad reflejada es $\sim \delta n^2$. La alta sensibilidad del OCT significa que reflexiones extremadamente pequeñas correspondientes a pequeños cambios en el índice de reflexión pueden ser medidos. Por ejemplo, si la sensibilidad de detección es de -100 dB, cambios en el índice en el rango de $\delta n = 10^{-4}$ - 10^{-5} pueden ser detectados.

Otro ejemplo de imágenes con OCT en estructuras con un retroesparcimiento débil son las imágenes oftalmológicas. Las figuras 3 y 4 muestran ejemplos. En estas, una alta

sensibilidad es esencial para obtener imágenes de estructuras como la retina que son nominalmente transparentes y tienen muy poco esparcimiento. En aplicaciones oftalmológicas, el contraste de imágenes en OCT debe a las diferencias en las propiedades de retroesparcimiento de los diferentes tejidos. Estructuras tales como el epitelio retiniano pigmentado (ERP) o la capa de fibra nerviosa de la retina puede diferenciarse de otras estructuras por las diferentes amplitudes de esparcimiento.

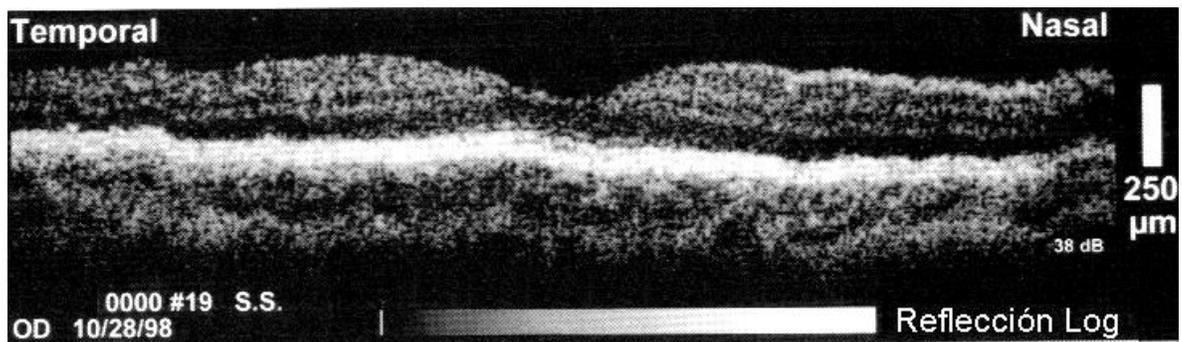


Fig. 3 Imagen OCT en escala de grises. La imagen muestra la diferenciación de las capas retíneas que es posible usando escala de grises. Imágenes típicas oftalmológicas abarcan un rango dinámico aproximadamente de 40-50 dB.

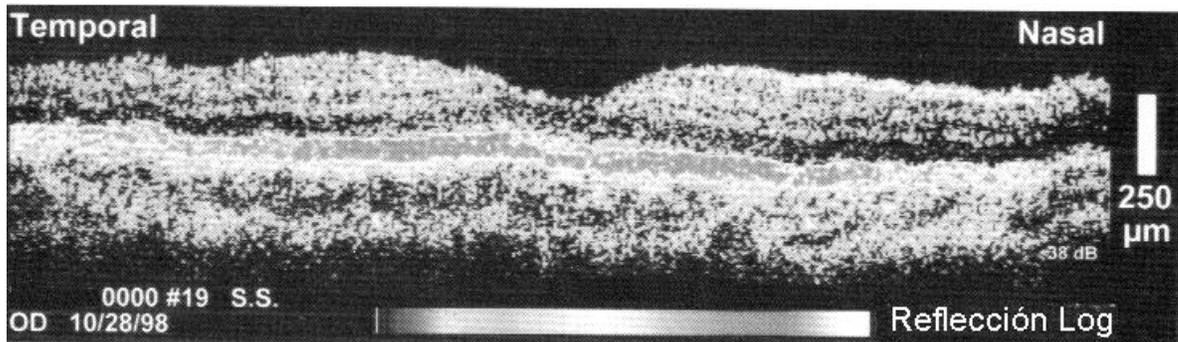


Fig. 4 Imagen OCT en falso color. La imagen muestra la diferenciación de las capas retíneas que es posible usando falso color. Imágenes típicas oftalmológicas abarcan un rango dinámico aproximadamente de 40-50 dB.

Típicas imágenes retíneas tienen niveles de señal dentro de -50 a -100 dB de la señal incidente. Para imágenes de la retina, los estándares de la ANSI gobiernan la luz de

exposición máxima permisible y pone los límites para la sensibilidad y la velocidad de obtención de imágenes en OCT.^{16,17,19}

El segundo caso límite en OCT, es obtener imágenes en un medio altamente esparcidor. La figura 5 muestra un ejemplo. En este caso, la sensibilidad de detección determina la máxima profundidad a la cual puede obtenerse una imagen. La mayoría de los tejidos producen un alto esparcimiento. Imágenes en OCT en otros tejidos diferentes a los

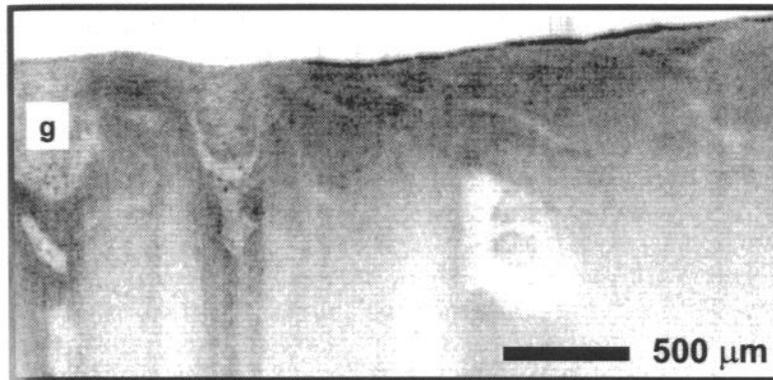


Fig. 5 Imagen en escala de grises de tejido esparcidor. Estas imágenes muestran una fuerte atenuación de la señal con la profundidad también como ruido moteado. Nótese la presencia de estructuras granulares (g) que presentan diferentes propiedades de esparcimiento.

ojos es posible por la utilización de longitudes de onda más largas, por ejemplo, 1.3 μm comparados con 800nm, puede reducir el esparcimiento incrementando la profundidad de penetración.²⁰⁻²³ La figura 6 muestra un ejemplo de OCT en una epiglotis humana in Vitro comparando imágenes obtenidas con longitudes de onda de 800 nm y 1300 nm. Los absorbentes dominantes en la mayoría de los tejidos son la melanina y la hemoglobina, las cuales presentan absorción en el rango de longitudes de onda del visible e infrarrojo cercano. La absorción del agua llega a ser apreciable para longitudes de onda cercanas a 1.9-2 μm. En la mayoría de los tejidos, el esparcimiento a longitudes de onda en el infrarrojo cercano

es uno o dos ordenes de magnitud más alta que la absorción. El esparcimiento decrece para longitudes de onda mas grandes, así que la penetración para OCT se incrementa.²⁴

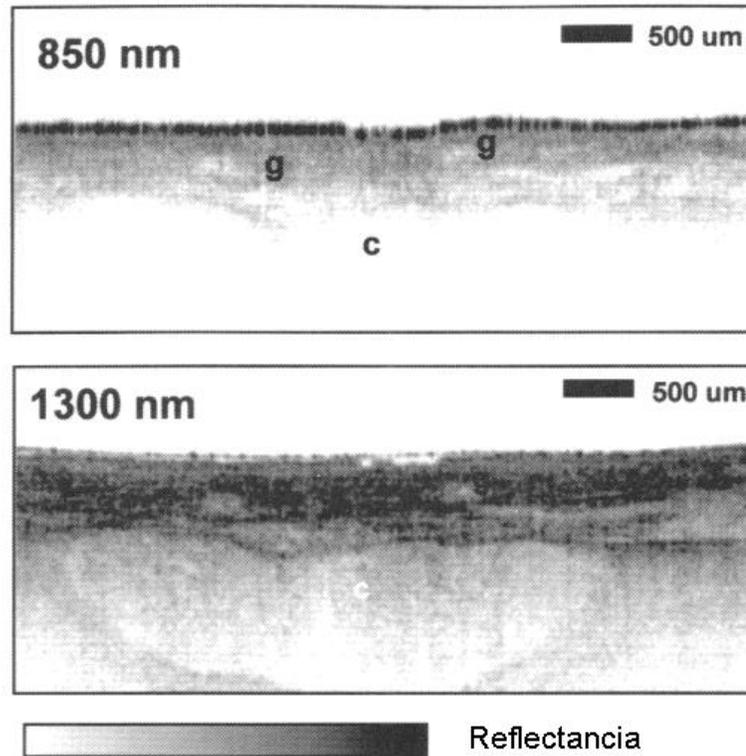


Fig. 6 Dependencia de la longitud de onda de la profundidad de penetración de la imagen en OCT. La atenuación por esparcimiento es reducida usando longitudes de onda más largas. Glándulas superficiales (g), pueden visualizarse a ambas longitudes de onda, pero el cartilago (c) más profundo solo se puede obtener imagen con luz de 1300 nm.

Por ejemplo, si un tejido tiene un coeficiente de esparcimiento en el rango de $\sim 40 \text{ cm}^{-1}$ en 1300 nm, la atenuación solo para el esparcimiento para una profundidad de 6 mm es de e^{-24} o $\sim 4 \times 10^{-11}$ Entonces, si el límite de sensibilidad de detección es de -100 dB , la señal es atenuada al limite de sensibilidad cuando atraviesa un espesor de 4-6 mm. Ya que la atenuación es exponencial con respecto a la profundidad, incrementando la sensibilidad

de detección en un orden de magnitud la profundidad de penetración no se incrementaría apreciablemente.

Los mecanismos de contraste de imagen en OCT en un medio que esparce la luz, han sido investigados y se relacionan con las propiedades ópticas del medio.²⁵ los mecanismos de contraste de imagen son en alguna forma análogos a los del ultrasonido.

Referencias

1. Dugay MA, Hansen JW. Optical sampling of subnanosecond light pulses. *Appl Phys Lett* 13:178-180, 1968.
2. Dugay MA, Mattick At. Ultrahigh speed photography of picosecond light pulses and echoes. *Appl Opt* 10:2162-2170, 1971.
3. Dugay MA. Light photographed in flight. *Am Sci* 59:551-556, 1971.
4. Bruckner Ap. Pico second light scattering measurements of cataract microstructure. *Appl Opt* 17:3177-3183, 1978.
5. Park H, Chodorow M, Kompfner R. High resolution optical ranging system. *Appl Opt* 20:2389-2394, 1981.
6. Fujimoto JG, De Silvestri S, Ippen EP, Puliafito CA, Margolis R, Oseroff A. Femtosecond optical ranging in biological systems. *Opt Lett* 11:150-152, 1986.
7. Yougquist RC, Carr S, Davies DEN. Optical coherence-domain reflectometry: A new optical evaluation technique. *Opt Lett* 12:158-160, 187.

8. Takada K, Yokohama I, Chida K, Noda J. New measurement system for fault location in optical waveguide devices based on an interferometric technique. *Appl Opt* 26:1603-1606, 1987.
9. Gilgen HH, Novak RP, Hodel W, Beaud P. Submillimeter optical reflectometry. *IEEE J Lightwave Technol* 7:1225-1233, 1989.
10. Fecher AF, Mengedoht K, Werner W. Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Opt Lett* 13:1867-1869, 1988.
11. Slivaz X, Marquis-Weible F, Salathe RP, Novak RP, Gilgen HH. High resolution reflectometry in biological tissues. *Optics Lett* 17:4-6, 1992.
12. Scmitt JM, Knuttel A, Bonner RF. Measurement of optical properties of biological tissues by low-coherence reflectometry. *Appl Opt* 32:6032-6042, 1993.
13. Hitzemberg CK. Optical measurement of the axial eye length by laser Doppler interferometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:616-624, 1991.
14. Huang D, Wang J, Lin CP, Puliafito CA, Fujimoto JG. Microresolution ranging of cornea and anterior chamber by optical reflectometry. *Lasers Surg Med* 11:419-425, 1991.
15. Scmitt JM, Lee SL, Yung KM. An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue. *Optics Commun.* 142:4-6, 203-207, Oct. 1997.
16. Hee MR, Izatt JA, Swanson EA, Huang D, Schuman JS, Lin CP, Puliafito CA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography of the human retina. *Arch Ophthalmol* 113:325-332, 1995.
17. American National Standards Institute. *Safe Use of Lasers*. New York: ANSI, 1993.
18. Chinn SR, Swanson EA. Multi-layer optical readout using direct or interferometric detection and broad-bandwidth light sources. *Opt Memory Neural Networks* 5:197-217, 1996.
19. Swanson EA, Izatt JA, Hee MR, Huang D, Lin CP, Schuman JS, Puliafito CA, Fujimoto JG. In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. *Opt Lett* 18:1864-1866, 1993.
20. Schmitt JM, Knuttel A, Yadlowsky M, Eckhaus MA. Optical coherence tomography of a dense tissue: Statistics of attenuation and backscattering. *Phys Med Biol* 39:1705-1720, 1994.
21. Schmitt JM, Knuttel A, Yadlowsky M, Bonner RF. Subsurface imaging of living skin with optical coherence tomography. *Dermatology* 191:93-98, 1995.

22. Fujimoto JG, Brezinski ME, Tearney GJ, Boppart SA, Bouma BE, Hee MR, Southern JF, Swanson EA. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nature Med* 1:970-972, 1995.
23. Brezinski ME, Tearney GJ, Bouma BE, Izatt Ja, Hee MR, Swanson EA, Southern JF, Fujimoto JG. Optical coherence tomography for optical biopsy: Properties and demonstration of vascular pathology. *Circulation* 93:1206-1213, 1996.
24. Parsa P, Jacques SL, Nishioka NS. Optical properties of rat liver between 350 and 2200 nm. *Appl Opt* 28:2325-2330, 1989.
25. Scmitt JM, Knuttel A. Model of opticalcoherent tomography of heterogeneous tissue. *J Opt Soc Am A* 14:1231-1242, 1997.

5. Tomografía coherente

5.1 procedimiento y resultados

La intensidad de un haz láser transmitido a través de un medio altamente esparcidor de la luz, es atenuado considerablemente debido a las pérdidas causadas por la absorción y, mucho más por el esparcimiento. De cualquier manera una pequeña fracción del haz láser es transmitida a través del medio sin sufrir algún evento de esparcimiento, pero la intensidad ($I_c(x)$) del haz a una profundidad (x) decrece con una función exponencial dependiendo de la suma integral de los coeficientes de absorción (μ_a) y esparcimiento (μ_s) del volumen radiado con el haz :

$$I_c(x) = I_0 \exp[-(\mu_a + \mu_s)x] \quad (5.1)$$

Estos fotones “colimados”, “balísticos” o “geométricos” se propagan de acuerdo con las leyes de óptica geométrica, como viajado a través de un medio no esparcidor como el agua pura.

De cualquier manera, hay una gran cantidad de luz esparcida, la cual se propaga a través del medio, enmascarando la pequeña cantidad de luz no esparcida que impacta al detector. Estos fotones esparcidos, no cumplen las leyes de la óptica geométrica. Mientras

viajan a través del medio, los fotones esparcidos toman varias trayectorias las cuales son funciones muy complicadas de las propiedades de absorción y esparcimiento de la región esparcidora irradiada en el medio.

Para un haz láser de tamaño infinito la intensidad de esparcimiento ($I_s(x)$) como función de la penetración puede ser analíticamente dada por la teoría de difusión. La intensidad de esparcimiento decrece como una función exponencial dependiendo del coeficiente de absorción efectivo (μ_{eff}) y en las condiciones frontera de la superficie¹.

$$I_s(x) = I_0 \{ A \cdot \exp[-(\mu_{eff})x] - 3 \exp[-(\mu_a + \mu_s)x] \} \quad (5.2)$$

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a((\mu_a + \mu_s)(1 - g))} \quad (5.3)$$

$$A = (5 - R_i) / \left[\left(1 + 2\mu_a / \mu_{eff} \right) - R_i \left(1 - 2\mu_a / \mu_{eff} \right) \right] \quad (5.4)$$

$R_i = 0$ donde las condiciones son semejantes

$R_i = 0.55$ para condiciones frontera aire / tejido

Para rayos láser finitos los cálculos analíticos por teoría de difusión es mucho más complicada y puede ser fácilmente hecha con métodos Monte Carlo. Por el método Monte Carlo, la distribución de intensidad relativa en eje calculada, para valores típicos de los coeficientes de absorción y esparcimiento de los tejidos en la región del infrarrojo cercano se demuestran en la Fig. 1 y se puede observar que la intensidad de esparcimiento se hace

mas pequeña con el decrecimiento del diámetro del haz aún para un haz de un diámetro de 1 mm.

Para luz esparcida, una evaluación global y local del comportamiento de absorción y

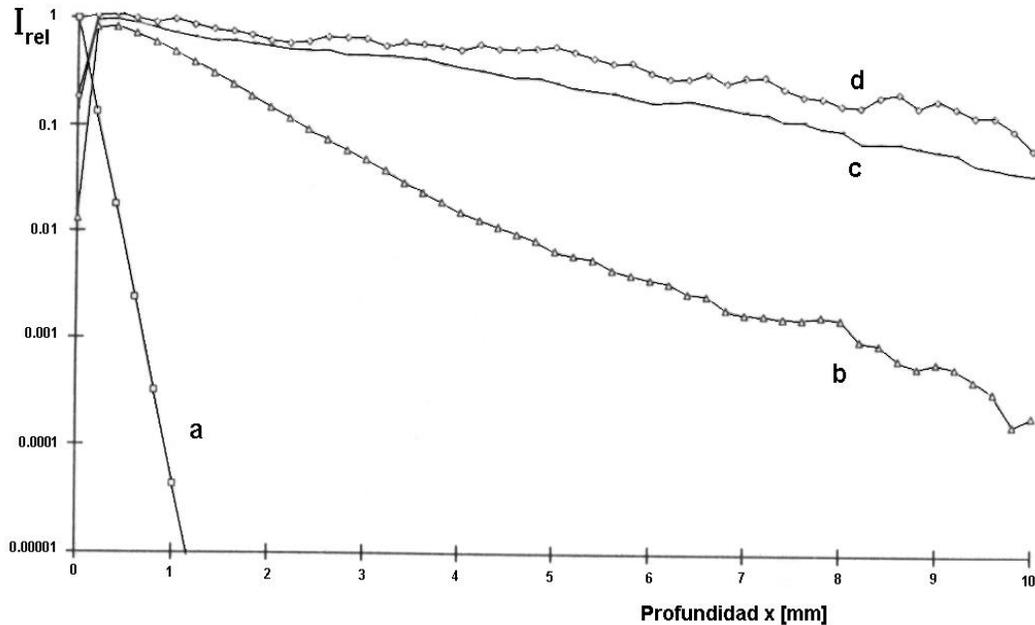


Fig. 1 Distribución de intensidad relativa en eje para un haz láser como función de la profundidad relativa para valores típicos del tejido en la región de infrarrojo cercano calculado Por métodos Monte Carlo ($\mu_s = 10 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_a = 0.05 \text{ mm}^{-1}$, $g = 0.97$)

- a) Intensidad del haz colimado
- b) Intensidad esparcida (diámetro del haz 1 mm)
- c) Intensidad esparcida (diámetro del haz 10 mm)
- d) Intensidad esparcida (diámetro del haz 50 mm)

esparcimiento de el medio por toda la luz transmitida, es en principio posible, pero muy complicado^{2,3}. Aplicando pequeñas aberturas, la luz esparcida puede ser reducida, pero no enteramente eliminada. Pero usando métodos, los cuales son capaces de medir solo la intensidad de los fotones colimados, las características de la integral de absorción y esparcimiento del volumen traspasado por el haz láser puede ser evaluado fácilmente por la ecuación (5.1) dada anteriormente.

Un método para distinguir entre fotones esparcidos y fotones colimados es llevar a cabo una medición resuelta en tiempo de la luz transmitida generada por un pulso láser ultracorto. Los fotones que llegan primero pueden considerarse los que han viajado por la trayectoria más corta a través del medio (como es descrito por la óptica geométrica)^{4,5}. No usamos este método, debido al alto costo de los componentes del arreglo, necesitaríamos un láser pulsado y un detector adecuado para detectar solo la primera parte del pulso, lo que acarrea el uso de una compuerta ultrarrápida.

Otro método para distinguir entre fotones colimados y esparcidos, consiste en buscar fotones con una fase inalterada. Solo los fotones colimados y no esparcidos están en fase con un haz de referencia, mientras que los fotones esparcidos tienen fases aleatorias, debido a las trayectorias aleatorias que tomaron a través del medio. Mezclando la luz transmitida con un desplazamiento en frecuencia, con una derivación del haz láser (haz de referencia), en un interferómetro Mach-Zehnder, la intensidad incidente en el detector para la luz esparcida es constante, por su fase aleatoria. Solo los fotones balísticos son capaces de producir modulación con una frecuencia dada por la frecuencia de modulación que sufre una parte del haz en el interferómetro.

La amplitud de esta modulación es directamente proporcional a la intensidad de la luz transmitida no esparcida y colimada.^{6,7}

5.2 Arreglo experimental

Para verificar la posibilidad de utilizar un arreglo interferométrico para distinguir entre fotones esparcidos y no esparcidos, un arreglo experimental simple fue empleado con un interferómetro Mach-Zehnder (Fig. 2), un láser HeNe 3 mW. Marca Oriel. Utilizamos este láser en la longitud de onda del rojo (633 nm) para probar el concepto, ya que esto nos facilitó la tarea de alinear el haz y el interferómetro para observar las franjas de interferencia, causadas por la interferencia del haz de referencia y el de muestreo, con una frecuencia dada por el espejo de modulación. En la Fig. 3 vemos los detalles del arreglo experimental, lentes, filtros y aberturas para limitar la luz difusa.

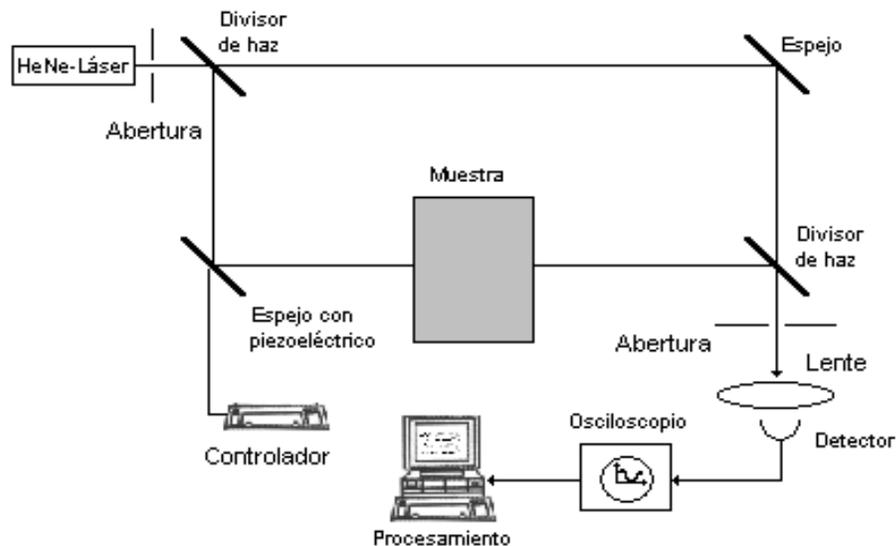


Fig. 2 Arreglo experimental basado en un interferómetro Mach-Zehnder, para la detección de fotones balísticos.



Fig. 3 Detalles del arreglo experimental para tomografía coherente de onda continua.

Como detector usamos un fotodiodo PIN HR-040, el rango espectral de este dispositivo va de los 350 nm a los 1100 nm. La responsividad y tiempo de respuesta de la serie HR están optimizados tal que muestra una responsividad de 0.350 A/W en 633 nm y tiempos de respuesta típicos de cientos de ps en -5 V, con un área activa de 0.77 mm², presentando una capacitancia de 4.9 pF y una corriente de oscuridad máxima de 2 nA y una NEP (potencia de ruido equivalente) de $1.9 \cdot 10^{-14}$ (W/ $\sqrt{\text{Hz}}$) para una longitud de onda de 830 nm y un encapsulado T0-18. El fotodetector operó en modo fotoconductor ya que presenta una respuesta lineal, un buen desempeño en condiciones de una señal muy pequeña. El circuito de polarización y amplificación se muestra en la Fig. 4. La señal se amplifica con un amplificador operacional OPA111, él cual es propicio para esta clase de

aplicación, con señales muy pequeñas, y que tiene las siguientes características: con una corriente de polarización de 1 pA máximo, bajo ruido $8 \text{ nV}\sqrt{\text{Hz}}$ (10 KHz).

En el sistema de detección podemos identificar dos fuentes de ruido: el ruido de disparo y el ruido térmico.

El ruido de disparo esta relacionado con la fluctuación estadística en la fotocorriente y en la corriente de oscuridad. La magnitud del ruido es expresado como la corriente cuadrática media (rms) de ruido:

$$I_{sn} = \sqrt{2q(I_p + I_D)\Delta f} \quad (5.5)$$

Donde $q = 1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$, es la carga del electrón, I_p es la corriente fotogenerada, I_D es la corriente de oscuridad y Δf es el ancho de banda de medición de ruido. En las condiciones de operación, la máxima corriente generada fue $0.8 \text{ }\mu\text{A}$, y la corriente de oscuridad reportada por el fabricante es de 0.3 nA , por lo que la corriente de ruido de disparo para un sistema de adquisición con un ancho de banda de 10 kHz , dado por el amplificador operacional es de:

$$I_{sn} = 0.05 \times 10^{-9} \text{ A}$$

El ruido térmico o Jonson, esta determinado por la resistencia de retroalimentación R_F en la ecuación:

$$I_{jn} = \sqrt{\frac{4k.T.\Delta F}{R_F}} \quad (5.6)$$

Donde $k = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$, es la constante de Boltzmann, T , es la temperatura absoluta en grados Kelvin (298 K), Δf es el ancho de banda, R_F es la resistencia de retroalimentación del amplificador ($10 \text{ M}\Omega$), considerando el mismo ancho de banda, obtenemos que la corriente de ruido térmico es:

$$I_{jn} = 4.05 \times 10^{-12} \text{ A}$$

La corriente total de ruido generada por el fotodetector se determina por:

$$I_m = \sqrt{I_{sn}^2 + I_{jn}^2} \quad (5.7)$$

para nuestro arreglo es de:

$$I_m = 50 \times 10^{-12} \text{ A}$$

La NEP se define como la potencia de luz incidente en el fotodetector, la cual genera una fotocorriente igual a la corriente de ruido. La NEP se define así:

$$NEP = \frac{I_m}{R_\lambda} \quad (5.8)$$

Donde R_λ es la responsividad en A/W y I_m es el ruido total del fotodetector. Usando la responsividad proporcionada por el fabricante de 0.35 A/W para una longitud de onda de 633 nm, la NEP del sistema es:

$$NEP = 1.43 \times 10^{-10} \text{ W}$$

La menor potencia medida sobre el detector fu de menos de 10 nW, por lo que la proporción entre potencia equivalente de ruido y potencia incidiendo en el detector era de un orden de magnitud.

Se utilizaron divisores de haz dicroicos de 50/50, ya que en un arreglo anterior se utilizo un divisor de haz de membrana de microcelulosa, el cual es mucho más delicado, con resultados similares por lo que se optó por la opción más económica.

Como medio se uso una pecera con agua, porque el índice de refracción del agua es muy parecido a el de los tejidos; para poder introducir en ella un recipiente con recipiente con agua, al cual se le agregaba la sustancia que producía el esparcimiento, así el cambio de induces de refracción era mínimo entre el agua y la muestra, después optamos por hacer el experimento en un solo recipiente. El medio esparcidor que usamos fue la leche, ya que presenta un alto esparcimiento y muy poca absorción. De esta manera podíamos caracterizar nuestro interferómetro para obtener el coeficiente de esparcimiento comparándolo con el obtenido fuera del interferómetro, de igual forma utilizamos un colorante azul como medio absorbente, tanto dentro del interferómetro como fuera de el en una medición directa, poniendo la muestra frente al la fuente y cambiando la concentración del colorante.

La modulación del rayo de referencia fue provista por un espejo con un actuador piezoeléctrico de Physik Instrumente, el modelo PZ 87E para desplazar uno de los espejos,

para la cual se fabrico la montura, con un controlador E-662 LVPZT, el cual varía la longitud del camino óptico, desplazando el espejo 0.3 o 0.6 $\mu m.$, que corresponden a un desplazamiento aproximado de media y una longitud de onda respectivamente (el desplazamiento mínimo del actuador era de 0.1 μm). La modulación la hicimos en el brazo del interferómetro que pasa a través de la muestra. En el brazo de referencia colocamos los filtros para atenuar la señal de referencia, y mantenerla en el mismo orden de magnitud al de la señal de la muestra, y así obtener un mejor contraste en las mediciones.

La amplitud de la modulación (en este caso a una frecuencia entre 4-7 hz.) fue medida con un osciloscopio Tektronix TDS 3052 de 2 canales 500 Mhz , conectado a la salida del amplificador del detector.

La resistencia dentro del arreglo del detector se fue variando de 10 a 50 $M\Omega$, para variar la ganancia ala salida del amplificador del detector; ya que las primeras mediciones se saturaba el detector por lo que se coloco una resistencia de 10 $M\Omega$ en paralelo con la de 50 $M\Omega$ y con señales pequeñas trabajamos con la resistencia de 50 $M\Omega$.

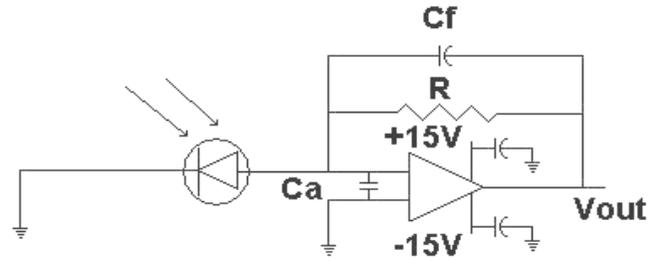
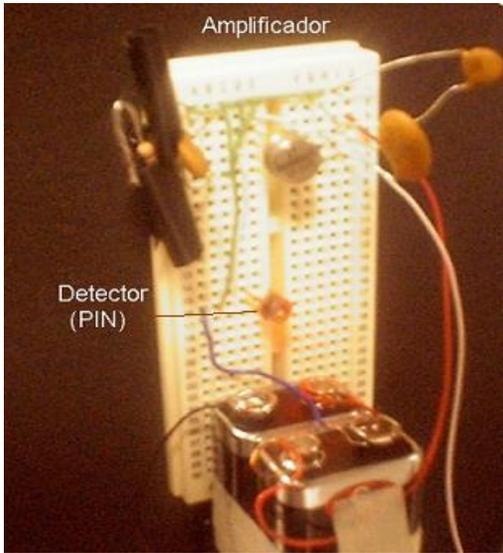


Fig. 4 Detector: diodo PIN con un amplificador y una resistencia variable R.

Se obtuvo una modulación en la señal de salida debida a la interferencia de los haces de la señal y referencia causada por los fotones balísticos o colimados que pasan por la muestra sin sufrir los efectos de esparcimiento o un cambio de fase (Fig. 5), con una frecuencia dada por la frecuencia del espejo, el nivel de DC esta dado por el total de radiación detectada.

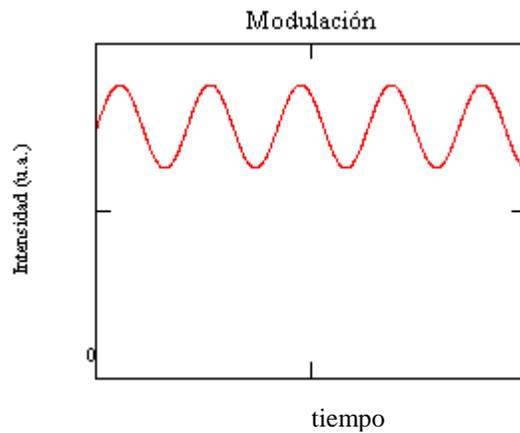


Fig. 5 La profundidad de modulación esta dada por la interferencia de los fotones colimados y el nivel de DC esta dada por la intensidad capturada en el detector del total de fotones balísticos y difusos.

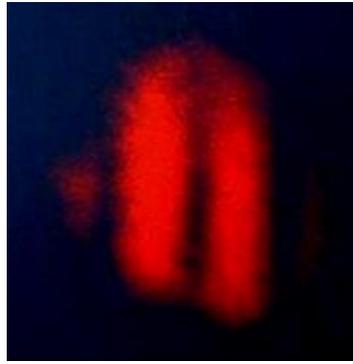


Fig. 6 Franjas de interferencia causadas por fotones “balísticos”.

En la Fig. 6 se puede observar que se forman franjas de interferencia en el detector, estas son debidas a la interferencia de el haz de la señal y el haz de referencia de los fotones que permanecen en fase al pasar por la muestra, es decir que no sufren eventos de esparcimiento (transmisión colimada), y el nivel de dc que se observa en la gráfica es debido a la transmisión de fotones que sufrieron algún evento de esparcimiento (transmisión difusa), por lo que cambiaron de fase, no producen modulación en la señal pero es detectada, lo que se traduce como un nivel en la intensidad , reduciendo el contraste en la señal detectada.

Utilizamos un lente convergente para expandir la señal de interferencia, para procurar que sólo una franja de interferencia ocupara el área activa del detector, si no expandemos el haz la señal se promediaría y no obtendríamos la modulación. Para mejorar el contraste se colocaron dos aberturas para limitar la radiación difusa uno ala entrada al interferómetro, y otra a la salida del mismo y antes de la lente expansora del haz. Así mismo utilizamos filtros en el brazo de referencia del interferómetro con la finalidad de

mejorar el contraste, dejando la intensidad de la radiación de cada brazo en el mismo orden de magnitud.

Se efectuaron diversas mediciones para comprobar el esparcimiento de un medio con partículas predominantemente esparcidoras (leche), variando el coeficiente de esparcimiento (Fig. 7). Las mediciones se hicieron midiendo la amplitud de modulación dada por el voltaje a la salida del amplificador con lo cual podemos obtener la intensidad de transmisión de los fotones colimados y en el mismo arreglo con la misma concentración del esparcidor, mediamos con el radiómetro la intensidad de la transmisión total a la salida de la muestra. El mismo procedimiento se aplicó, pero para un medio absorbente, un colorante azul, (Fig. 8), en las cuales se normalizó la gráfica. En este arreglo con la longitud de onda del láser He-Ne, se logró detectar modulación en una señal 73,500 veces menor a la señal de incidencia en la muestra, (97 dB) ya que el mínimo valor medido en el radiómetro (New Port modelo 815) fue de $0.012 \mu W$, con una señal incidiendo en la muestra de $0.883 mW$.

De las mediciones hechas se deben determinar tres parámetros ópticos de los tejidos, coeficientes de esparcimiento, absorción y función de fase (μ_s, μ_a y g).

Donde μ_t es el coeficiente de extinción y es determinado de los valores de transmitancia colimada, lo cual permite que los tres parámetros (μ_s, μ_a y g) sean encontrados de los datos experimentales de T_t y R_d .

Los parámetros medidos son la transmisión colimada T_c , al transmisión total T_t y por consiguiente la transmisión difusa T_d , reflexión difusa R_d y la absorción. (En el caso más simple, se utiliza el método de dos flujos de Kubelka-Munk).

$$\mu_t = \mu_s + \mu_a, \quad \mu_s' = \mu_s(1 - g) > \mu_a, \quad (5.9)$$

Con tres de las siguientes cinco mediciones son suficientes para la evaluación de los tres parámetros ópticos:

- Transmitancia total (o difusa) para radiación colimada o difusa.
- Reflectancia total (o difusa) para radiación colimada o difusa.
- Absorción de la muestra.
- Transmitancia colimada.
- Distribución angular de la radiación esparcida por la muestra.

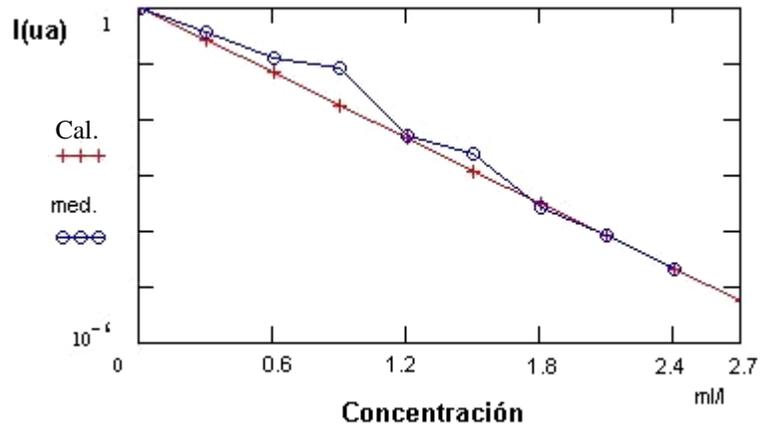


Fig. 7 Variación del coeficiente de esparcimiento en función de la concentración para una muestra con grosor de 10 cm

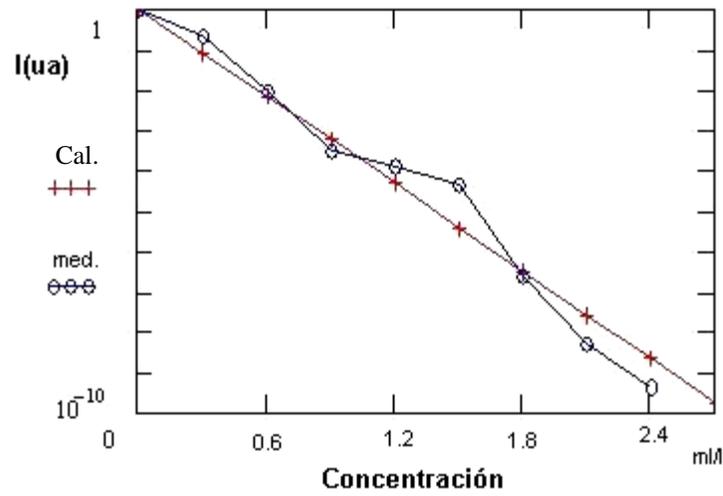


Fig. 8 Variación del coeficiente de absorción en función de la concentración para una muestra con grosor de 10 cm.

Referencias

1. M. Star, J. Marjinissen, M. van Germert, Light dosimetry in optical phantoms and in tissues in: Multiple flux and transport theory, Phys. Med. Biol., Vol. 33, No.4, 437-454, 1988
2. J. Singer, F. Grünbaum, P.Kohn, J. Zubelli. Image Reconstruction of the Interior of Bodies that diffuse radiation. Science, Vol.248, 990-993, 1990
3. F. Grünbaum. Diffuse Tomography, Time Resolved Spectroscopy and Imaging of Tissue, SPIE, Vol.1431, 232-238, 1991
4. S. Anderson-Engels, R. Berg, S. Svanberg, O. Jarlman. Time resolves transillumination for medical diagnostics. Opt. Lett., Vol. 15, No21, 1179-1181, 1990
5. J. Hebden. Time-resolved attenuation of transmitted laser pulses by a homogenous scatterig medium, Opt. Lett., Vol. 17, No6, 444-446, 1992
6. H. Inaba. Coherent Detection Imaging for medical laser Tomography in: Medical Optical Tomography, SPIE, Vol.6, 1993
7. J. Beuthan, K. Dörschel, G. Muller, B. Messer. Image oblique structures in scattering media by time gated viewing and coherence imaging, (CI), SPIE, Vol. 1888, 1993

Conclusiones

Al inicio de este trabajo expusimos la importancia de emplear radiación no ionizante para tomografía óptica. Planteamos también los inconvenientes que presenta el intervalo espectral útil (600-1500 nm), principalmente por esparcimiento. Logramos distinguir entre la radiación de trayectoria balística de la esparcida, cuando esta pasa a través de un medio esparcidor. Logramos demostrar que es posible recuperar la información útil para realizar tomografía óptica en onda continua empleando un arreglo interferométrico Mach-Zendher, modulando la señal óptica de uno de los brazos (donde se coloca la muestra). La modulación se realiza mediante el cambio de camino óptico por medio de un espejo montado en un micro-posicionador piezoeléctrico.

Esta modulación nos permitió distinguir y cuantificar la radiación que viaja en trayectoria directa a través de la muestra de la que se esparce, pues ésta última pierde coherencia y no interfiere (sólo contribuye en la irradiancia constante sobre el plano de interferencia). Empleando una pequeña abertura circular antes del detector bloqueamos gran parte de la radiación esparcida (toda aquella que no sigue la trayectoria del haz colimado), reduciendo significativamente esta contribución de irradiancia constante. Para mantener un buen factor de modulación, colocamos un fotodetector en el plano de interferencia, de tal forma que solo una fracción de la franja cubriera la superficie activa del detector.

Empleando una base de medio esparcidor estándar (phantom) caracterizamos el arreglo experimental. Para tal efecto, controlábamos la concentración del esparcidor y de manera independiente su coeficiente de absorción. Así pudimos cuantificar y corroborar los coeficientes de esparcimiento y absorción. Como fuente de iluminación usamos un láser de 633 nm (1 nW de potencia incidente en la muestra), que facilitaba la implementación de este arreglo, pues de otra manera, empleando una fuente de infrarrojo cercano, hubiéramos que tenido que alinear y ajustar con un visor.

Para mejorar el contraste de la señal controlamos la intensidad del brazo de referencia del interferómetro, porque la señal se atenúa al incrementar la concentración del compuesto esparcidor o absorbente. Para reducir los efectos refractivos del medio empleamos un haz de 1mm de diámetro. Modulando el camino óptico a baja frecuencia (8 Hz) y promediando 4 ciclos logramos mejor relación señal ruido. Con nuestro arreglo experimental logramos mediciones cuando la potencia de salida se reduce hasta unos pocos nanoWatts.

A partir de estas mediciones pudimos determinar la intensidad de potencia total transmitida y la intensidad de transmisión de radiación de trayectoria balística. La transmisión balística junto con la colimada o balística nos proporciona la transmisión total, al pasar por un medio que presenta alto esparcimiento de la luz. La mayor cantidad de información de relativamente fácil reconstrucción es transportada por la radiación de trayectoria balística.

En el área activa del detector debe incidir sólo una fracción de franja de interferencia, para poder detectar la modulación cuya frecuencia corresponde a la del espejo modulador. Si incidieran varias franjas el resultado es que se promediarían en toda el área del detector disminuyendo enormemente el contraste. Por esta razón utilizamos una lente para amplificar el patrón de interferencia.

La amplitud de la componente de modulación de la intensidad detectada es proporcional a la transmitancia colimada (de radiación de trayectoria balística) y del promedio de transmitancia obtuvimos la transmisión difusa que no causa modulación (T_d , es la transmisión difusa). De igual forma se determina la parte de la radiación reflejada en forma difusa R_d (retroesparcimiento), mediante el radiómetro.

Los parámetros ópticos de los tejidos (μ_s, μ_a) fueron calculados por diferentes métodos. Esta aproximación implicó la determinación secuencial o simultánea de los tres parámetros: transmitancia colimada $T_c = I(d)/I(0)$, la transmitancia total $T_t = T_c + T_d$ y transmitancia difusa.

Este instrumento puede mejorarse si detectan potencias del orden de pW. Actualmente la relación potencia de la señal de salida es 75000 veces menor a la de la

entrada, y se pueden llevar a más de 140 dB (señal de salida 10,000,000 veces menor a la entrada) cambiando la longitud de onda de iluminación, el tipo de detector y el tamaño de palabra del digitalizador. La longitud de onda se puede mover al infrarrojo (menor a 2 μm porque empieza una fuerte absorción del agua) porque hay menos esparcimiento y mejor penetración. El fotodetector puede cambiarse por uno de avalancha Para la región del infrarrojo (con una región de agotamiento extendida). Y finalmente, el tamaño de palabra del digitalizador de señales se puede incrementar de 9 a 16 bits penetración.

Apéndice A

Longitud de onda (nm)	Penetración (μm)
250	2
280	1.5
300	6
350	60
400	90
450	150
500	230
600	550
700	750
800	1200
1000	1600
1200	2200

Tabla 1. Profundidad aproximada de penetración de radiación óptica de una muestra de piel ligeramente caucásica a un valor de $1/e$ (37%) de la intensidad de energía incidente.

N	Capa	$\mu_a(\text{cm}^{-1})$	$\mu_s(\text{cm}^{-1})$	G	n	Grosor(mm)
1	Epidermis	25	480	0.79	1.5	0.065
2	Dermis superior	2.7	187	0.82	1.4	0.565
3	Plexo Sanguíneo	25	400	0.98	1.35	0.09
4	Dermis inferior	2.7	187	0.82	1.4	0.565
5	Grasa subcutánea	0.2	20	0.80	1.45	0.32
6	Pared de vaso sanguíneo	6	414	0.91	1.37	0.61
7	Sangre	25	400	0.98	1.35	6.38

Tabla 2. Parámetros ópticos de los tejidos para $\lambda = 633\text{nm}$

Capa	$\mu_a(\text{cm}^{-1})$	$\mu_s(\text{cm}^{-1})$	g
Epidermis	40	420	0.852
Dermis	1.7	175	0.852
Aorta: Media	1.6	250	0.88
Aorta: Intima	2	150	0.84
Aorta: Adventicia	4	180	0.84

Tabla 3. Parámetros ópticos de algunos tejidos para $\lambda = 800\text{nm}$

Tejido	$\lambda(\text{nm})$	$\mu_a(\text{cm}^{-1})$	$\mu_s(\text{cm}^{-1})$	g	Método - Observaciones
Aorta	632	0.52	316	0.87	Henyeey – Greenstein
Aorta T. M.	633	3.6	171	0.85	Delta – Eddington
Aorta T. I.	633	2.3	310	0.9	Delta – Eddington
Aorta T. A.	633	5.8	195	0.81	Delta – Eddington
Aorta	1064	2	-	-	Foto acústica
Músculo	515	11.2	530	-	Atenuación total
Piel (dermis)	633	2.7	187	0.81	Henyeey – Greenstein
Piel (dermis)	635	1.8	244	-	Ley de Beer
Sangre (Hb-O ₂)	665	1.3	1246	0.995	Eritrocitos 41% Usando teoría de Mie
Sangre (Hb-O ₂)	960	2.84	505	0.992	
Sangre (Hb)	665	4.87	509	0.995	
Sangre (Hb)	960	1.68	668	0.992	

Tabla 4. Propiedades ópticas de tejidos