

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOINGENIERÍA MÉDICA

DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



“DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE UN DISPOSITIVO CON GEOMETRÍA DE HAZ ESTRECHO PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE ATENUACIÓN LINEAL DE LUZ EN TEJIDO BIOLÓGICO MURINO “

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOINGENIERÍA MÉDICA

PRESENTA

P.L.B.M. ANGELICA PAOLA PEREZ JIMENEZ  
P.L.B.M. EDWIN ARTURO CAPULA VELÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. EN C. EUGENIO TORRES GARCÍA

REVISORES

MTRO. EN I.B. EDGAR GABRIEL DEL HIERRO GUTIÉRREZ  
MTRA. EN A.H. MA. ELENA MARTÍNEZ ROMERO

TOLUCA DE LERDO, ESTADO DE MÉXICO, 2022

**“DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE UN DISPOSITIVO CON  
GEOMETRÍA DE HAZ ESTRECHO PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE  
ATENUACIÓN LINEAL DE LUZ EN TEJIDO BIOLÓGICO MURINO”**

# Índice

Índice .....	5
Índice de figuras .....	8
Índice de tablas .....	11
Acrónimos y abreviaturas utilizadas .....	12
Resumen .....	13
Abstract.....	15
Marco teórico.....	17
1. Luz .....	18
2. Propiedades de la luz .....	18
2.1 Reflexión .....	19
2.2 Refracción .....	20
2.3 Absorción .....	21
2.4 Transmitancia.....	22
3. Coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ).....	23
4. Coeficiente de dispersión ( $\mu_s$ ) .....	23
5. Coeficiente de atenuación lineal ( $\mu$ ).....	24
5.1 Ley de Lambert-Beer .....	25
6. Transporte de la luz en tejido biológico.....	26
7. Atenuación de haz estrecho .....	27
7.1 Geometría de haz estrecho .....	27
8. Fuentes de luz .....	28
8.1 Direccionalidad del laser.....	30
8.2 Ángulo sólido y Angulo plano .....	31
9. Detector (Espectrofotómetro) .....	32
10. Modelo animal para experimentación científica.....	33

11. Técnica histológica .....	34
11.1. Pasos de la técnica histológica .....	35
Planteamiento del problema .....	37
Justificación.....	39
Hipótesis .....	40
Meta de Ingeniería.....	40
Objetivo General .....	41
Objetivos específicos .....	41
Metodología.....	42
1. Diseño del dispositivo (geometría de haz estrecho). .....	42
1.1. Elección de componentes para validar el dispositivo.....	43
1.1.1. Láseres para validación experimental.....	43
1.1.2. Muestras del modelo animal .....	44
1.2. Dimensiones del diseño basados en la teoría. ....	45
1.3. Diseño tridimensional .....	49
2. Elementos para la construcción del dispositivo.....	54
2.1. Materiales para la construcción del dispositivo .....	55
2.1.1. Carcasa: MDF. ....	55
2.1.2. Recubrimiento de la carcasa: pintura.....	55
2.1.3. Riel de apoyo. ....	55
2.2. Elementos para la instalación del sistema. ....	56
2.2.1. Mesa de instalación.....	56
2.2.2. Instalación del láser.....	56
2.2.3. Base del espectrofotómetro.....	57
2.2.4. Instalación del dispositivo.....	58
3. Validación del dispositivo. ....	58
3.1 Modelo Animal para validación.....	59

3.2 Obtención de las muestras histológicas.....	59
3.3 Ensayos. ....	60
4. Procesamiento de la señal.....	63
4.1. Cálculo de los picos máximos de las señales (fotones vs. longitud de onda) 65	
4.2. Obtención de número de número de fotones por método de la integral. ....	67
4.3 Curva de dispersión.....	69
4.4 Coeficiente de atenuación lineal .....	70
Implicaciones éticas.....	72
Resultados.....	73
1. Dispositivo con geometría de haz estrecho .....	73
2. Instalación del sistema.....	75
3. Muestras histológicas .....	77
4. Cálculo de fotones por método de picos.....	78
5. Cálculo de fotones por método de la integral.....	81
6. Coeficiente de atenuación lineal.....	83
Discusión .....	92
Conclusiones.....	94
Trabajo a futuro .....	96
Referencias .....	98
Anexo 1: Planos del dispositivo (medidas en cm).....	103
Anexo 2: Plano explosionado del dispositivo .....	108
Anexo 3: Código para calcular los picos máximos de las pruebas en Matlab® .....	109
Anexo 4: Código para calcular el área bajo la curva de las pruebas en Matlab® .....	112

## Índice de figuras

Figura 1. Espectro electromagnético [1].....	17
Figura 2. Ley de la reflexión. ....	19
Figura 3. Reflexión difusa y especular. ....	20
Figura 4. Refracción de la luz.....	21
Figura 5. Absorción y transformación de la luz a calor. ....	22
Figura 6. Efecto de la transmitancia. ....	22
Figura 7. Coeficiente de absorción. ....	23
Figura 8. Arreglo geométrico propuesto de haz estrecho.....	28
Figura 9. Principales diferencias entre la luz láser y la luz ordinaria.....	29
Figura 10. Divergencia del haz del puntero láser. Imagen tomada de [29]. ....	30
Figura 11. Angulo sólido bajo un radio $\theta$ que representa la divergencia del haz de un láser. Imagen tomada de [32]. ....	31
Figura 12. Representación gráfica de la ecuación de ángulo plano. Imagen tomada de [33]. ....	32
Figura 13. BLUE-Wave espectrómetro de StellarNet Inc®.....	44
Figura 14. Representación visual para S2 .....	46
Figura 15. Representación visual para R2, $\alpha$ , S2 y para el valor de Aesf. ....	47
Figura 16. Representación visual para A y para nuestro cálculo de Acir.....	48
Figura 17. Vista superior de la base de anclaje. ....	50
Figura 18. Vista superior de las caras laterales del dispositivo. ....	50
Figura 19. Vista superior de la base del dispositivo.....	51
Figura 20. Vista superior de la cara anterior (entrada de la fuente de luz).....	51
Figura 21. Mientras que a y b funcionan como anclaje para la pieza c, la pieza c nos permitió acoplar el láser con el diámetro más pequeño al dispositivo. ....	52
Figura 22. Mientras que a y b funcionan como anclaje para la pieza c, la pieza c nos permitió colimar la entrada del haz de luz de cada láser a 0.25mm. ....	52
Figura 23. Vista superior de la cara posterior (entrada del detector). ....	52
Figura 24. Vista isometría de la tapa del dispositivo.....	53
Figura 25. Ensamble final del diseño conceptual del dispositivo.....	54
Figura 26. Imagen conceptual del sistema basados en el diseño del dispositivo, vista lateral. ....	54

Figura 27. Riel incorporado al sistema que permite cambiar la distancia del portaobjetos y el láser.....	55
Figura 28. Clip ajustable incorporado en el riel para sujetar el portaobjetos. Imagen tomada de [74].....	56
Figura 29. Superficie de la mesa óptica donde se instaló todo el sistema. ....	56
Figura 30. Kit de instalación para montaje del láser sobre mesa óptica. Altura ajustada a 8cm, se logra observar los tornillos fijadores para la mesa óptica. ....	57
Figura 31. Base de acrílico para el espectrofotómetro instalada en la mesa óptica. ....	58
Figura 32. Varillas roscadas de acero galvanizada de $\varnothing$ ¼ In y 5cm de alto.....	58
Figura 33. Perillas de ajuste para el láser en los recuadros rojos. ....	61
Figura 34. Laser de longitud de onda de 850 nm. Donde solo es posible visualizar el láser con la cámara del celular, se puede apreciar como el láser pasa a través de la muestra histológica. ....	61
Figura 35. Señal de ruido (fondo) con el láser apagado. ....	62
Figura 36. Datos sin procesar, señal resultante del software SpectraWiz®. ....	63
Figura 37. Señal filtrada donde se ha eliminado el ruido de fondo. ....	63
Figura 38. Señal segmentada a la curva de fotones captados según la longitud de onda. ....	64
Figura 39. Pico máximo de cada señal. ....	65
Figura 40. El * azul marca el pico promedio de datos calculados.....	66
Figura 41. Señal promedio. ....	68
Figura 42. El comando trapz ayuda a contar todos los datos bajo la curva, en este caso el número de fotones. ....	69
Figura 43. Grafica de decaimiento exponencial. Donde podemos encontrar la curva de dispersión en color verde, la desviación estándar en color azul y la función matemática. ....	70
Figura 44. Vista lateral del dispositivo con geometría de haz estrecho. ....	73
Figura 45. Vista superior del dispositivo.....	74
Figura 46. Caras externas. A) cara anterior, B) cara posterior del dispositivo.....	74
Figura 47. Vista superior de la parte interna del dispositivo, donde se aprecia el colimador, el riel y el clip ajustable.....	75
Figura 48. Sistema instalado en la mesa óptica. ....	76

Figura 49. Acoplo de componentes exteriores. A) El espectrofotómetro se encuentra sobre la base construida para tener la altura correcta respecto al dispositivo, B) acoplamiento del láser en su respectiva base con el dispositivo. ....	76
Figura 50. Muestras histológicas de hígado de ratón murino para la investigación, desde 3 a 35 $\mu\text{m}$ . ....	77
Figura 51. Muestra de 35 $\mu\text{m}$ instalada en el dispositivo, donde el láser de 532 nm interactúa con la muestra. ....	78
Figura 52. Grafica del comportamiento de la luz de 532 nm con el tejido biológico por el método de pico máximo. Comportamiento decaimiento exponencial.....	80
Figura 53. Señales promedio obtenidas con el láser de 850 nm para las 10 muestras histológicas. ....	81
Figura 54. Grafica del comportamiento de la luz de 532 nm con el tejido biológico por el método de la integral. ....	82
Figura 55. Grafica del comportamiento de la atenuación de la luz de 532 nm con el tejido biológico a) método picos máximos b) método de la integral. ....	83
Figura 56. Coeficiente de atenuación lineal para 405 nm en hígado murino. ....	85
Figura 57. Coeficiente de atenuación lineal para 450 nm en hígado murino. ....	86
Figura 58. Coeficiente de atenuación lineal para 532 nm en hígado murino. ....	87
Figura 59. Coeficiente de atenuación lineal para 635 nm en hígado murino. ....	88
Figura 60. Coeficiente de atenuación lineal para 780 nm en hígado murino. ....	89
Figura 61. Coeficiente de atenuación lineal para 850 nm en hígado murino. ....	89
Figura 62. Coeficiente de atenuación lineal para 980 nm en hígado murino. ....	90
Figura 63. Curvas de dispersión para las 7 longitudes de onda.....	91

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los láseres según su medio.....	29
Tabla 2. En la siguiente tabla se exponen las características más importantes en base a la longitud de onda que detectan los espectrofotómetros [36]. .....	33
Tabla 3. En la siguiente tabla se exponen las características más importantes con base en la longitud de onda de los láseres a usar en este experimento [69]. .....	43
Tabla 4. Por cada muestra histológica (por cada corte) se registraron 5 señales, y en cada longitud de onda se evaluaron las 10 distintas muestras histológicas.....	59
Tabla 5. Límites superiores e inferiores para el manejo de datos donde se encuentra el mayor número de fotones captados para cada longitud de onda. ....	64
Tabla 6. 5 señales de cada muestra histológica con cada longitud de onda. ....	67
Tabla 7. Muestras con las que se trabajaron (véase Fig. 50). .....	77
Tabla 8. Picos máximos de cada una de las 5 señales obtenidas de la muestra de 3 $\mu\text{m}$ y con el láser de 532 nm. ....	78
Tabla 9. Base de datos con el número promedio de fotones en el pico para cada corte versus cada longitud de onda del láser. ....	79
Tabla 10. Base de datos desviación estándar de las 5 señales de cada corte versus cada longitud de onda del láser. ....	80
Tabla 11. Base de datos de número de fotones bajo la curva para cada corte versus cada longitud de onda del láser. ....	82
Tabla 12. Base de datos desviación estándar de las 5 señales de cada corte versus cada longitud de onda del láser con el método de área bajo la curva. ....	83
Tabla 13. Valores de $t_1$ para cada longitud de onda con su respectivo error. ....	84
Tabla 14. Resultado para los valores de $\mu\alpha$ y $\mu\beta$ . ....	84
Tabla 15. Coeficiente de atenuación lineal para cada longitud de onda.....	84

## Acrónimos y abreviaturas utilizadas

<b><i>n</i></b>	Índice de refracción
<b><i>T</i></b>	Transmitancia
<b><math>\mu_a</math></b>	Coefficiente de absorción
<b><math>\mu_s</math></b>	Coefficiente de dispersión
<b><math>\mu</math></b>	Coefficiente de atenuación lineal
<b><i>I<sub>t</sub></i></b>	Número de fotones finales
<b><i>A</i></b>	Absorbancia
<b>Láser</b>	Light amplification by stimulated emission of radiation (amplificación de luz por emisión estimulada de radiación)
<b>Nm</b>	Nanómetros
<b>sr</b>	Estereorradián
<b><math>\Omega</math></b>	Angulo sólido
<b><math>\alpha</math></b>	Angulo plano
<b>DOT</b>	Diffuse Optical Tomography (tomografía óptica difusa)
<b>OCT</b>	Optical coherence Tomography (tomografía óptica coherente)
<b>PPGI</b>	Photoplethysmographic Image (fotoplethysmografía de imágenes)
<b>PDT</b>	Photodynamic Therapy (Terapia fotodinámica)
<b>Mm</b>	Milímetros
<b>Cm</b>	Centímetros
<b><math>\emptyset</math></b>	Angulo
<b>mrad</b>	Miliradianes
<b>MDF</b>	Tablero de fibra de densidad media
<b>Hz</b>	Hertz
<b>V</b>	Volts
<b>In</b>	Pulgadas
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b><math>\mu m</math></b>	Micrómetros
<b>S</b>	Desviación estándar muestral.

## Resumen

El coeficiente de atenuación lineal ( $\mu$ ) es un parámetro que nos ayuda a medir que tan rápido la luz incidente se atenúa al pasar a través de un medio; y esto ha permitido el análisis cuantitativo de las propiedades que puedan tener los tejidos biológicos a partir del cálculo de dicho coeficiente, por lo que un cálculo exacto de este parámetro facilitaría la diferenciación óptica de tejidos biológicos, también mejoraría los procedimientos que se utilizan al día de hoy en las técnicas diagnósticas de terapia óptica, por ejemplo, la tomografía de coherencia óptica (OCT) o la terapia fotodinámica (PDT).

Las propiedades ópticas previamente reportadas con diferentes métodos varían ampliamente entre sí, por lo que una buena estimación de las propiedades ópticas del tejido biológico es crucial para el modelado teórico de los tratamientos con luz en la medicina. Según lo reportado en la literatura el tejido absorbe y dispersa la luz con longitudes de onda entre los 650 y 1300 nm, la ventana terapéutica.

El objetivo de este trabajo de tesis en primer lugar fue diseñar y construir un dispositivo con geometría de haz estrecho que permitió determinar el coeficiente de atenuación lineal de tejido biológico, ya que se sabe que esta técnica es útil para determinar dicho coeficiente para radiaciones ionizantes. Sin embargo, no ha sido utilizada para determinar el coeficiente de atenuación lineal óptico. Y, en segundo lugar, para encontrar el coeficiente de atenuación lineal para tejido de hígado murino.

Para la construcción y desarrollo del dispositivo de haz estrecho, se determinaron las características físicas del sistema con base a las necesidades de la geometría. Se construyó con MDF de 6 mm de espesor y se recubrió con color negro mate. Finalmente, se validó el dispositivo y se llevaron a cabo pruebas para determinar el coeficiente  $\mu$ . Estas mediciones se llevaron a cabo en tejido de hígado murino, con espesores desde los 3  $\mu\text{m}$  hasta los 35  $\mu\text{m}$ , y estos grosores de tejido a su vez se evaluaron con láseres de longitudes de onda desde los 405 nm hasta 980 nm.

Como resultados se encontraron los coeficientes de atenuación lineal de dicho tejido que van desde los 941  $\text{cm}^{-1}$  hasta los 1960  $\text{cm}^{-1}$ , lo que concuerda con lo reportado previamente con ciertos autores, que realizaron el cálculo con diferentes metodologías. Sin embargo, nuestros resultados son más parecidos al  $\mu$  para la sangre, por lo que podemos decir que el hígado usado no tuvo una exanguinación completa. Podemos concluir que nuestro dispositivo con geometría de haz estrecho permite determinar de manera más exacta el coeficiente de atenuación lineal, así como discriminar la radiación

dispersa de fotones y únicamente realizar el registro cuantitativo de los fotones balísticos que atraviesan la muestra.

## Abstract

Linear attenuation coefficient ( $\mu$ ) is a parameter that helps measure how quickly incident light attenuates when passing through a medium; and this has allowed the quantitative analysis of the properties that biological tissues may have from the calculation of linear attenuation coefficient, so that an accurate calculation of this parameter would facilitate the optical differentiation of biological tissues, it would also improve the procedures that are used today in optical therapy diagnostic techniques, for example, optical coherence tomography (OCT) or photodynamic therapy (PDT).

Optical properties previously reported with different methods vary widely from each other, so a good estimation of the optical properties of biological tissue is crucial for theoretical modeling of light treatments in medicine. As reported in the literature, the tissue absorbs and scatters light at wavelengths between 650 and 1300 nm, therapeutic window.

The objective of this thesis was firstly to design and build a device with narrow beam geometry that allowed determining the linear attenuation coefficient of biological tissue, since this technique is known to be useful to determine this coefficient for ionizing radiation. However, it has not been used to determine the optical linear attenuation coefficient. And secondly, to find the linear attenuation coefficient for murine liver tissue.

For the construction and development of the narrow beam device, the physical characteristics of the system were determined based on the geometry requirements. It was built with 6 mm thick MDF and covered with matte black color. Finally, the device was validated, and tests were performed to determine the  $\mu$  coefficient. These measurements were made with murine liver tissue, with thicknesses from 3  $\mu\text{m}$  to 35  $\mu\text{m}$ , and these tissue thicknesses in turn were evaluated with lasers of wavelengths from 405 nm to 980 nm.

As results, the linear attenuation coefficients of such tissue were found, ranging from 941  $\text{cm}^{-1}$  to 1960  $\text{cm}^{-1}$ , which agrees with what was previously reported by certain authors, who performed the calculation with different methodologies. However, our results are more like to  $\mu$  for blood, so we can say that the liver used did not have a complete exsanguination. We can conclude that our device with narrow beam geometry makes it possible to determine the linear attenuation coefficient more accurately, as well as

discriminate scattered photon radiation and only perform the quantitative recording of the ballistic photons passing through the sample.

## Marco teórico

La radiación no ionizante es un tipo de radiación de baja energía que no es capaz de eliminar un electrón de un átomo. La radiación no ionizante incluye la luz visible, infrarroja, ultravioleta, las microondas, las ondas de radio y la energía de radiofrecuencia del espectro electromagnético.

El espectro electromagnético es el rango de todas las radiaciones electromagnéticas posibles, se ha dividido en diferentes regiones, pero que no tienen fronteras rígidas establecidas entre estas regiones (véase Fig. 1) [1].

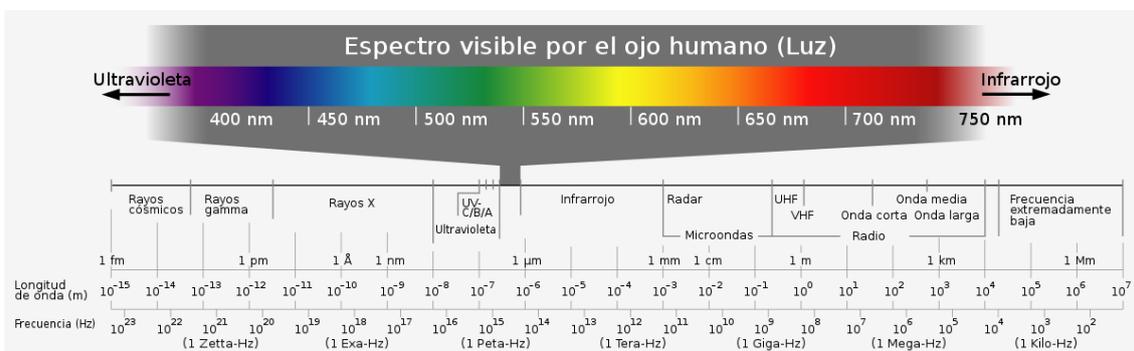


Figura 1. Espectro electromagnético [1].

En los últimos años se ha presentado un importante desarrollo en las técnicas de diagnóstico y terapia que tienen como principio la interacción de la luz con el tejido, es decir radiación no ionizante [2].

Dichas técnicas aprovechan la penetración de la luz a niveles detectables, que se producen cuando la radiación no ionizante con longitudes de onda comprendidas entre 600 y 1600 nanómetros (nm), llamada ventana terapéutica, incide sobre el tejido biológico [3].

Dentro de algunas técnicas terapéuticas, se pretende cuantificar el fenómeno que se produce cuando la luz interactúa con el tejido; absorción, dispersión y paso directo de fotones son algunos ejemplos, esta medición depende de la configuración empleada para el análisis de la muestra, la cual puede ser por reflexión o transmisión [4].

## 1. Luz

La luz es una onda electromagnética con una frecuencia alta y una longitud de onda corta. Un rayo de luz es la dirección en la que se propaga la energía de una onda de luz. La longitud de onda es la distancia entre dos frentes de onda consecutivos con la misma fase.

La óptica es la ciencia que estudia el origen, la propagación y la técnica de detección de la luz, contemplando la luz no solo como la radiación electromagnética visible al ojo humano, sino también como la infrarroja y la ultravioleta [5].

La luz está formada por partículas llamadas fotones, entonces, se puede decir que los fotones son la unidad básica que contienen en si misma todas las formas de radiación electromagnética. Los fotones también se pueden comportar en forma de onda cuando sufre una refracción. En cambio, funciona como una partícula cuando interactúa con otra superficie a la que le traspasa su energía (principalmente en forma de calor) [6].

En el transporte de la luz, los fotones que cruzan el medio dispersivo (tejido biológico) se dividen en tres componentes:

- Componente *balístico*, son fotones que se propagan manteniendo la dirección de la luz incidente.
- Componente *difusivo*, aquellos fotones que interactúan durante su paso a través del tejido, emergiendo de la misma con dirección y fase aleatoria.
- Componente “*tortuoso*” (*snake*), todos aquellos fotones que sufren interacción al atravesar la muestra sin embargo conservan, en cierto grado, las propiedades del haz de luz original.

## 2. Propiedades de la luz

Ciertas propiedades de la luz dependen del tipo de fuente que las emita, como el color, la intensidad, etc. Sin embargo, existen otras propiedades que son comunes a todos los tipos de luz.

A partir del principio del tiempo mínimo de Fermat, se obtienen las leyes de la reflexión y de la refracción de un modo muy sencillo. El principio de Fermat afirma que la trayectoria real que sigue un rayo de luz entre dos puntos es aquella en la que emplea un tiempo mínimo en recorrerla. La velocidad de la luz en el vacío es aproximadamente a 300 000 km/s y se representa por la letra  $c$ . En otros medios transparentes la velocidad es  $v$  y es menor que  $c$  y su valor dependerá totalmente de las características del medio [7].

## 2.1 Reflexión

La primera ley enuncia que el rayo incidente, el reflejado y la normal a la superficie están en un plano común (Véase Fig. 2).

La segunda ley enuncia que la magnitud del ángulo de reflexión es igual a la magnitud del ángulo de incidencia.

La reflexión sucede cuando la luz incide en una superficie. La dirección en que sale reflejada la luz viene determinada por el tipo de superficie.

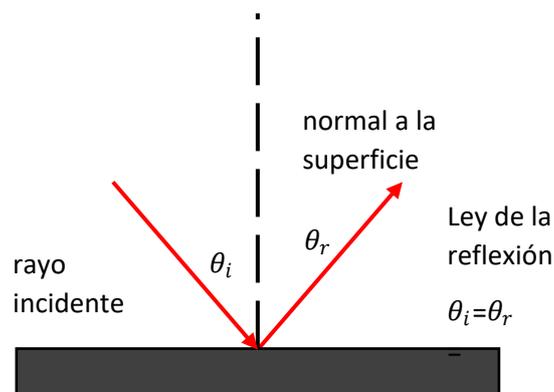


Figura 2. Ley de la reflexión.

No todas las superficies reflejan luz de la misma manera: puede ser reflexión difusa, especular o una combinación de ambas.

La reflexión difusa ocurre en superficies rugosas, no pulidas o mates entonces la luz se refleja en distintas direcciones (Véase Fig. 3).

La reflexión especular se presenta en superficies pulidas, de espejo o brillantes. En este caso es válida la ley de la reflexión, que dice que el ángulo de reflexión es el mismo que el de incidencia (Véase Fig. 3) [8].

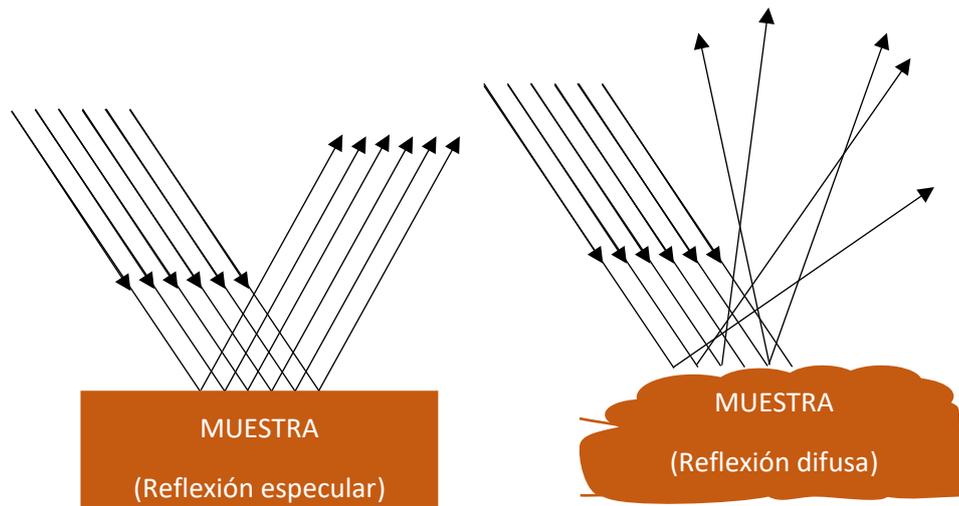


Figura 3. Reflexión difusa y especular.

## 2.2 Refracción

La refracción puede definirse como el cambio de dirección que sufre una onda a través de un medio material a otro. Sólo se producirá si la onda incide oblicuamente sobre la superficie de separación de los dos medios y si estos tienen índices de refracción distintos.

La refracción se origina en el cambio de velocidad de propagación de la onda, cuando pasa de un medio a otro. [9]

Así si un haz de rayos luminosos incide sobre la superficie de un cuerpo transparente, parte de ellos se reflejan mientras que otra parte se refracta, es decir penetran en el cuerpo transparente experimentando un cambio en su dirección de movimiento (Véase Fig. 4).

Se define el índice de refracción como la velocidad de la luz en el vacío o ( $c = 3 \times 10^8$  m/s), dividido por la velocidad de la luz en el medio.

$$n = \frac{c}{v} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío,  $v$  es la velocidad de la luz en el medio.

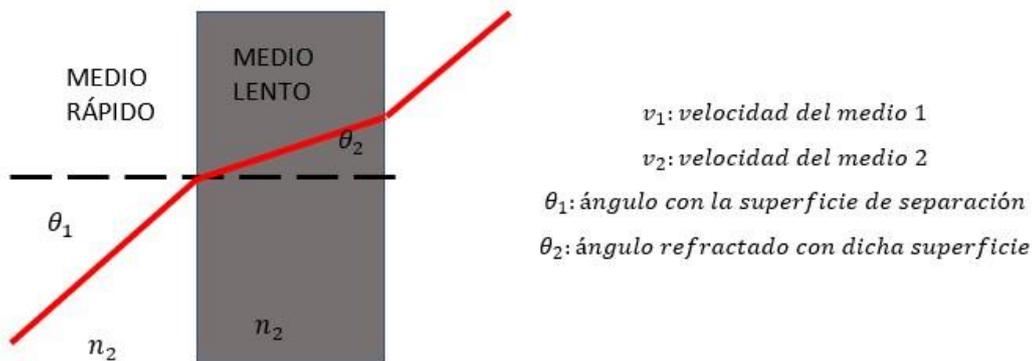


Figura 4. Refracción de la luz.

El índice de refracción de la luz en el vacío es 1. La velocidad de propagación máxima de la luz es en el vacío, por lo tanto, en los demás medios este índice es  $n > 1$ . Ejemplos de valores típicos de  $n$  son los del aire (1.0003), agua (1.33), vidrio (1.46 – 1.66) o diamante (2.42) [10,11].

### 2.3 Absorción

La absorción es el proceso por el cual la luz es captada o retenida por la materia ya sea parcial o totalmente.

La absorción de luz depende del material con el que interactúa, en general todos los materiales son absorbentes pero cada material retiene un determinado rango de longitudes de onda del espectro electromagnético. Aquellos que absorben en todo el rango de la luz visible son llamados materiales opacos, mientras que si dejan pasar la luz en todo el rango se les llama transparentes [12].

Cuando la absorción se produce dentro del rango de la luz visible, recibe el nombre de absorción óptica. Esta radiación, al ser absorbida puede ser reemitida, es decir convertirse en otro tipo de energía, como en calor o una reacción química. (Véase Fig. 5).

Es precisamente el proceso de absorción, transmisión y reflexión lo que da color a la materia [13].

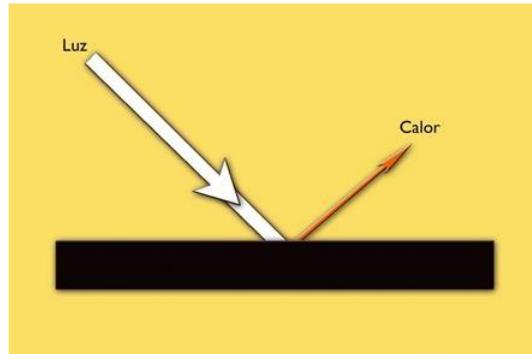


Figura 5. Absorción y transformación de la luz a calor.

#### 2.4 Transmitancia

Si se considera que se tiene una fuente emisora de luz que hace llegar a una muestra un haz de radiación, con una potencia de  $I_0$ , la muestra con un cierto espesor  $b$  absorbe una cierta cantidad de esa radiación incidente, por lo que la potencia del haz disminuye al atravesar la muestra, dejando entonces la nueva potencia  $I_t$  [14].

El cociente entre la potencia de la radiación que sale de la muestra y la de la que incidió sobre ella, se define como transmitancia:

La transmitancia se describe entonces como la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra,  $I_t$ , y la cantidad de luz que incidió sobre ella,  $I_0$  (véase Fig. 6), y se representa normalmente en tanto por ciento:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad \text{Ecuación 2}$$

Esta ecuación establece una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre  $T$  y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa [15].

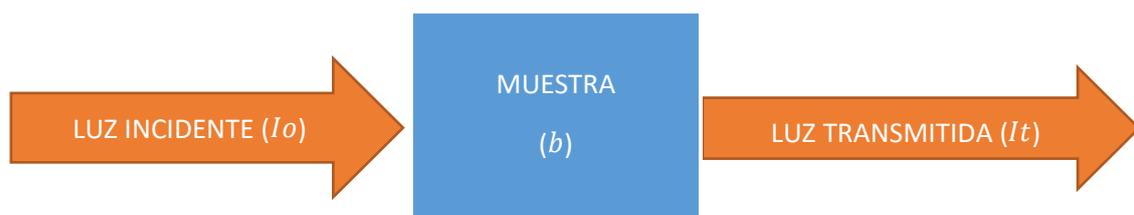


Figura 6. Efecto de la transmitancia.

En esta figura se muestra el efecto de transmitancia, donde nuestra luz transmitida o número de fotones finales ( $I_t$ ) es menor que la luz incidente ( $I_0$ ), debido a que nuestra muestra, de acuerdo con su espesor ( $b$ ) ha absorbido un porcentaje de la potencia inicial.

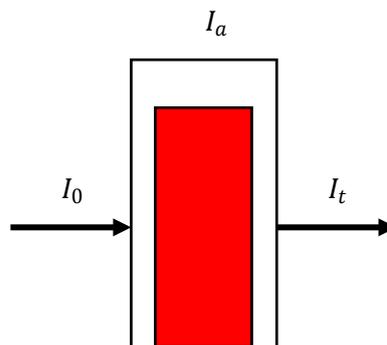
### 3. Coeficiente de absorción ( $\mu_a$ )

El coeficiente de absorción se encarga de medir hasta donde un haz de luz de una cierta longitud en particular puede penetrar en el material antes de ser absorbido. Esto dependerá estrictamente del material y su grosor, así también como de la longitud de onda de la luz que está siendo absorbida. En un material con un bajo coeficiente de absorción, la luz se absorbe mal, y si el material es lo suficientemente delgado, parecerá transparente a esa longitud de onda. Entonces el coeficiente de absorción de luz dependerá de la distancia que atraviesa la onda a través del tejido [16].

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de densidad  $I_0$  incide perpendicularmente sobre un material, este absorberá una parte de la radiación incidente ( $I_a$ ) y dejará pasar el resto ( $I_t$ ), de forma que se cumple: (véase Fig. 7)

$$I_0 = I_a + I_t$$

*Ecuación 3*



*Figura 7. Coeficiente de absorción.*

### 4. Coeficiente de dispersión ( $\mu_s$ )

El coeficiente de dispersión se define como el número de eventos de dispersión por unidad de longitud; describe la efectividad de las estructuras del tejido para dispersar fotones. Es el inverso de la distancia promedio entre eventos de dispersión. Está

directamente relacionado con la densidad de los dispersores. La unidad del coeficiente de absorción es  $\text{cm}^{-1}$ .

La dispersión óptica puede describirse como dispersión por partículas que tienen un índice de refracción diferente del medio circundante, o como dispersión por un medio con un índice de refracción continuo pero fluctuante.

Los tejidos están dominados por la dispersión,  $\mu_s \gg \mu_a$ . Donde  $\mu_s$  es el coeficiente de dispersión y  $\mu_a$  es el coeficiente de absorción [17].

## 5. Coeficiente de atenuación lineal ( $\mu$ )

Cuando un haz monoenergético de fotones  $I_0$  fotones/ $\text{cm}^2\text{s}$ , choca de forma perpendicular sobre un material con un espesor  $x$ , se produce atenuación o reducción del número de fotones incidentes ( $I_0$ ) del haz y depende del tipo de material, del grosor y de la energía de los fotones que interactúan con el material [18].

La atenuación antes explicada se representa por la siguiente expresión matemática:

$$I_t = I_0 e^{-\mu x} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

$I_0$  = número de fotones incidentes

$I_t$  = número de fotones finales

$x$  = espesor de la muestra o material

La cantidad  $\mu$  es llamada el coeficiente lineal de atenuación, o simplemente el coeficiente de atenuación. Este coeficiente representa la cantidad de fotones que interactúan por unidad de espesor de la materia. Se suele expresar en  $\text{cm}^{-1}$ .

Por tanto, el coeficiente lineal de atenuación ( $\mu$ ) es la suma del coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ) y el coeficiente de dispersión ( $\mu_s$ ).

$$\mu = \mu_s + \mu_a$$

*Ecuación 5*

Cuando se divide dentro de la densidad  $\rho$  del medio de atenuación, se obtiene el coeficiente de atenuación masico  $\mu/\rho$  (cm<sup>2</sup>/g ó m<sup>2</sup>/kg).  $\mu$  también es conocido como «coeficiente de atenuación de geometría de haz estrecho».

### 5.1 Ley de Lambert-Beer

Esta ley describe el método matemático, el cual es utilizado para expresar la manera en que la materia absorbe la luz. En óptica, la Ley de Beer afirma que la totalidad de luz que resulta de una muestra puede disminuir debido a tres fenómenos de la física [19]:

1. El número de materiales de absorción en su trayectoria o concentración, que en este caso es tejido biológico.
2. Las distancias que la luz debe atravesar a través de la muestra o distancia del trayecto óptico.
3. Las probabilidades que hay de que el fotón de esa amplitud particular de onda pueda absorberse por el material, es la absorbancia.

Y puede ser expresada de la siguiente manera:

$$A = -\epsilon cd$$

*Ecuación 6*

*A: absorbancia*

*$\epsilon$ : coeficiente molar de extinción*

*c: concentración molar del tejido absorbente*

*d: trayecto optico (cm)*

Conforme la luz atraviesa un medio absorbente, la cantidad de luz absorbida en cualquier volumen corresponde a la intensidad de luz que incide, este valor se multiplica por el coeficiente de la absorción. La transmitancia se refiere a la relación que existe entre los fotones iniciales y los fotones finales según la ecuación 2.

Esta relación se puede expresar conforme la Ley de Lambert-Beer, tenemos que:

$$T = 10^{-\epsilon cd}$$

*Ecuación 7*

*T: transmitancia*

*$\varepsilon$ : coeficiente molar de extinción*

*c: concentración molar del tejido absorbente*

*d: trayecto optico (cm)*

La ecuación 7 expresada como la transmitancia se puede trazar con relación a la concentración, pero esta relación no es lineal. Aunque el logaritmo negativo en base 10 de la transmitancia sí es lineal con la concentración. Siendo que  $\varepsilon cd$  de la ecuación 7 es igual a la Absorbancia

(A) De esta forma, la absorción es medida como [20]:

$$A = \log_{10}(T) \quad \text{Ecuación 8}$$

Sustituyendo Ecuación 2 en Ecuación 8 tenemos que:

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_t}{I_o}\right) \quad \text{Ecuación 9}$$

Por lo tanto, la absorbancia y la Transmitancia se pueden obtener conociendo la cantidad de radiación inicial y radiación final siguiendo la Ley de Lambert-Beer.

## **6. Transporte de la luz en tejido biológico**

Las propiedades ópticas de un tejido impactan en las aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas de la luz. La capacidad de la luz para penetrar en un tejido, interactuar con este, depositar energía, y salir del tejido para su detección, es clave para las aplicaciones de técnicas médicas. Debido a que el tejido biológico está compuesto por distintas moléculas, materiales en distintas capas; y además las moléculas tienen una parte o conjunto de átomos responsables de su color llamados cromóforos; electrones capaces de absorber energía o luz visible y excitarse para emitir diversos colores dependiendo de la longitud de onda, las propiedades ópticas de un tejido se describen en términos del coeficiente de absorción  $\mu_a$  ( $\text{cm}^{-1}$ ), el coeficiente de dispersión  $\mu_s$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) [21].

## 7. Atenuación de haz estrecho

Existen dos métodos generales para alcanzar la atenuación de haz estrecho:

1. Geometría de haz estrecho, la cual impide a cualquier partícula dispersa o secundaria de alcanzar el detector, de acuerdo con un arreglo óptico físico en el dispositivo de adquisición.
2. Discriminación de todas las partículas dispersas y secundarias que logran alcanzar al detector, en función de la energía de las partículas, habilidad de penetración, dirección, coincidencia, etc. [22].

### 7.1 Geometría de haz estrecho

La geometría de haz estrecho supone que el haz de radiación culmina en la detección de una cantidad menor de fotones en el otro extremo (detector). La pérdida se hace por dispersión y atenuación (véase Fig. 8) [23].

Características físicas del arreglo con geometría de haz estrecho:

- 1) Menor distancia posible, entre la fuente y el atenuador ( $d$ ). Esta distancia no cambiará el comportamiento de las partículas, las cuales tendrán una incidencia normal en el atenuador.
- 2) Una distancia mayor que  $d$  entre el atenuador y el detector. Cada partícula desviada dentro del atenuador se perderá del detector.
  - La intensidad de las *partículas primarias* en el detector es independiente de la distancia del atenuador.
  - La intensidad de las *partículas primarias desviadas* y *de las secundarias* disminuye en función del cuadrado de esta distancia.
- 3) El haz está colimado para cubrir uniformemente el detector, lo que disminuye el número de partículas primarias desviadas y de las secundarias generadas dentro del atenuador [24].

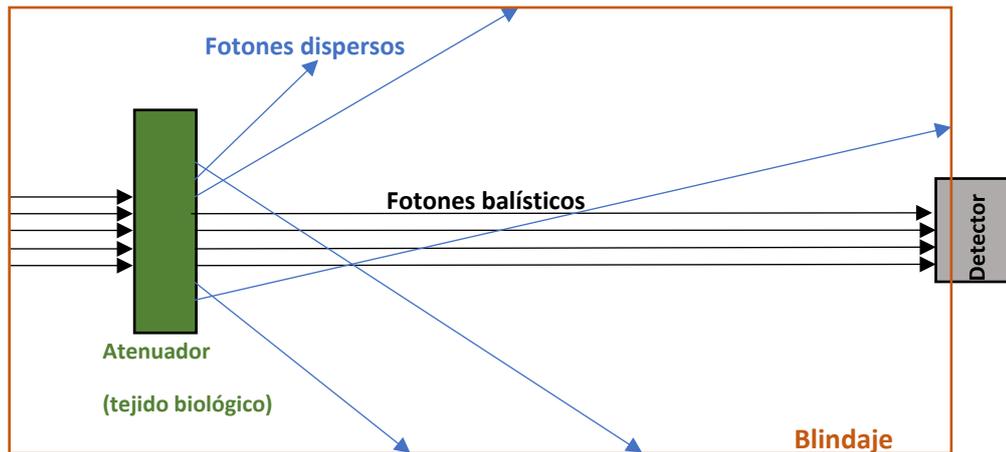


Figura 8. Arreglo geométrico propuesto de haz estrecho.

Esta figura ilustra la geometría de haz estrecho. Un haz estrecho de fotones; el atenuador (tejido biológico) es muy delgado, por lo que normalmente se tiene una pequeña cantidad de eventos de interacción (absorción de fotones en el tejido). El detector tiene un colimador para que solo se detecten fotones que no experimentan interacción. Si un fotón sufre una interacción, en algunas circunstancias el fotón se eliminará por completo o se absorberá (con un alto porcentaje de absorción) por el blindaje que es un recubrimiento. En otras circunstancias, es posible que el fotón se disperse o desvíe a una energía más baja. Por esta razón, es necesario limitar, tanto la energía de estos fotones, como el tiempo que tardan en llegar al detector.

## 8. Fuentes de luz

Debido a que los láseres son haces de luz artificial, poseen características que se diferencian de la luz natural, esto les permite ser utilizados en distintas aplicaciones dentro de la ciencia.

El término “láser” es un acrónimo en inglés, lo que significa “light amplification by stimulated emission of radiation” (amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación).

La luz láser emite haces de luz con alta directividad, esto quiere decir que las ondas de luz viajan juntas en línea recta, casi no existe la dispersión, mientras que las fuentes de luz ordinarias o natural emiten ondas de luz que son dispersadas en todas direcciones.

Otra diferencia entre ambos tipos de luz es que las ondas electromagnéticas en un rayo láser tienen el mismo color (monocromaticidad), por otro lado, la luz ordinaria generalmente es una mezcla de varios colores que se combinan y al final producen un efecto de luz blanca (véase Fig. 9) [25].

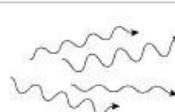
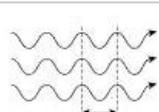
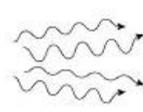
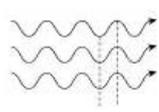
	Luz ordinaria	Luz laser
<b>Directividad (rectitud)</b>	 Bombilla	 Láser
<b>Monocromaticidad</b>	 Longitudes de onda no uniformes	 Longitudes de onda uniformes
<b>Coherencia</b>	 Fase no uniforme	 Los picos y valles están alineados.

Figura 9. Principales diferencias entre la luz láser y la luz ordinaria.

Conforme viajan las ondas de luz en un rayo láser, éstas oscilan en perfecta sincronización, una característica conocida como coherencia (véase Fig. 9). Gracias a que la luz láser siempre se encuentra en coherencia y no se dispersa mucho, esta luz puede viajar largas distancias y a su vez concentrar mucha energía en un área muy pequeña [26].

Los láseres se pueden clasificar según su medio, estos se dividen por lo general en cuatro principales grupos. Existen componentes que varían según la clasificación del láser, como pueden ser el medio del láser, la estructura, la longitud de onda de oscilación y la fuente de excitación. El medio del láser es el material que contiene átomos que convierten la luz de bombeo en luz láser (ver Tabla 1) [27].

Tabla 1. Clasificación de los láseres según su medio.

Tipo	Medio	Longitud de onda de oscilación (nm)
Láser de estado sólido	Nd: YAG, ND: YVO4	1064
Láser de gas	CO <sub>2</sub>	10600

Láser de semiconductor	AlGaAs, AlGaInP, GaN, etc.	Varios
Láser de fibra	Fibra dopada Nd/Yb	1000 a 1150

### 8.1 Direccionalidad del láser

La radiación que sale del láser, lo hace en cierta dirección, y se dispersa con un ángulo de divergencia.

La divergencia significa que, durante la propagación del haz, la misma cantidad de energía se disemina sobre un área mayor y se describe en el orden de mili-radianes.

La direccionalidad es la característica que causa que el haz viaje en una dirección simple dentro de un cono angosto de baja divergencia, sin embargo, en un punto lejano del centro del haz, el radio de este aumentara de forma lineal, eso significa que la propagación del haz, a medida que se aleja del detector perderá cierto grado de potencia que se encuentra confinada, manteniéndose el 86% de la potencia inicial y el cono de proyección aumente [28], a esto se le conoce como “divergencia angular, dispersión angular o divergencia del haz”. El diámetro del haz se mide entre los dos puntos en los que la potencia decrece hasta  $\frac{1}{e^2}$  del máximo valor (véase Fig. 10).

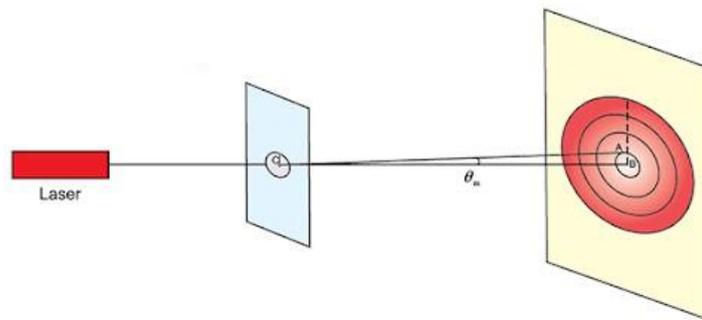


Figura 10. Divergencia del haz del puntero láser. Imagen tomada de [29].

El valor aproximado de la propagación angular cuando se conoce la longitud de onda  $\lambda$ , está dada por:

$$\Delta\theta \approx \lambda/D \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde  $\Delta\theta$  el ángulo de,  $\lambda$  la longitud de onda de haz y D es el diámetro del haz a la salida del puntero [30].

## 8.2 Ángulo sólido y Angulo plano

El ángulo sólido es el ángulo espacial que abarca un objeto visto desde un punto dado, que se corresponde con la zona del espacio limitada por una superficie cónica. Mide el tamaño aparente de ese objeto.

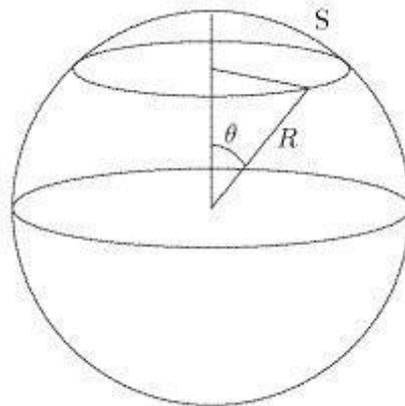
La unidad del ángulo sólido en el SI es el estereorradián, cuyo símbolo es **sr**. Es una magnitud adimensional que se representa con la letra griega  $\Omega$  [31].

Para calcular el ángulo sólido bajo el cual se ve un objeto desde un punto, se proyecta el objeto sobre una esfera de radio  $R$  conocido, centrada en el punto de vista (véase Fig. 11) [32]. Si la superficie de la proyección del objeto sobre la esfera es  $S$ , el ángulo sólido bajo el cual se ve el objeto es:

$$\Omega = \frac{S}{R^2} \quad \text{Ecuación 11}$$

El ángulo sólido bajo el cual se ve un casquete esférico cuyo radio se ve bajo un ángulo  $\theta$  desde el centro de la esfera, es:

$$\Omega = 2\pi (1 - \cos\theta) \quad \text{Ecuación 12}$$



*Figura 11. Angulo sólido bajo un radio  $\theta$  que representa la divergencia del haz de un láser. Imagen tomada de [32].*

Un ángulo plano  $\alpha$  es una medida de la abertura entre dos rectas que se interceptan en un punto [33].

Si con centro en el vértice de un ángulo tal como el ángulo  $\alpha$  mostrado en la figura 3 se traza una circunferencia auxiliar de radio  $R_1$ , se obtiene un arco de longitud  $s_1$  de manera

que su cociente da como resultado la medida de  $\alpha$ . Si para el mismo ángulo se traza una nueva circunferencia auxiliar de radio  $R_2$  con centro en su vértice se obtiene un arco de longitud  $s_2$ , dando su cociente como resultado la misma medida  $\alpha$  y así sucesivamente (véase Fig. 12), es decir,

$$\alpha = \frac{s_1}{R_1} = \frac{s_2}{R_2} \dots \frac{s_n}{R_n} \quad \text{Ecuación 13}$$

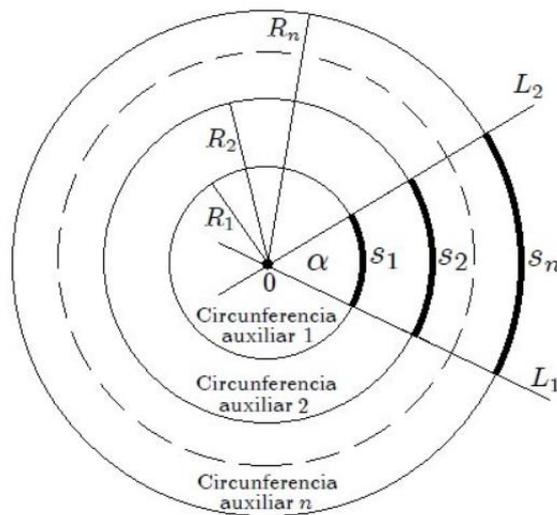


Figura 12. Representación gráfica de la ecuación de ángulo plano. Imagen tomada de [33].

Cualquiera que sea el tamaño de la circunferencia auxiliar, la ecuación 13 se mantendrá constante para la misma abertura entre las rectas.

## 9. Detector (Espectrofotómetro)

Un espectrofotómetro es un instrumento óptico que permite la medición de las propiedades de la luz del espectro en longitudes de onda específicas.

Los espectrofotómetros permiten la medición del espectro en todas las longitudes de onda para la luz visible además de otras regiones del espectro electromagnético (ultravioleta e infrarrojo), estos aíslan la luz de longitudes de onda específica a partir de la luz blanca por medio de un monocromador, es decir, rompe la luz en su espectro [34].

La variable medida es la longitud de onda, sin embargo, se pueden tener otras variables.

Configuración óptica del espectrofotómetro:

- *Haz simple*: Un solo haz, el blanco y la muestra se miden de manera consecutiva.
- *Doble haz*: La fuente de luz emite un solo haz de luz, este se divide por un cortador, creando un par de haces de igual energía e idéntico camino óptico. Uno de estos transmite la referencia y el otro la muestra.
- *Haz dividido*: El haz se divide a través de un divisor, de tal modo se envía la luz a través del blanco y la muestra de manera simultánea, se tienen dos detectores. Esta configuración permite medir de manera simultánea tanto el blanco y la muestra [35].

A continuación, en la tabla 2 se puede observar algunos espectrofotómetros disponibles en el mercado, así como sus principales características.

**Tabla 2. En la siguiente tabla se exponen las características más importantes en base a la longitud de onda que detectan los espectrofotómetros [36].**

<b>Espectrofotómetro</b>	<b>Rango espectral</b>	<b>Dimensiones</b>
<b>StellarNet's newest NIR</b>	900-1700 nm	12.7x7.62x5.08 cm
<b>StellarNet's GREEN-Wave</b>	350-1100 nm	12.7x7.5x2.5 cm
<b>StellarNet's BLUE-Wave miniature</b>	200-1150 nm	12.7x7.5x2.5 cm
<b>The BLACK-Comet spectrometer</b>	190-850 nm	15x10x6.9 cm

## **10. Modelo animal para experimentación científica.**

El origen de la experimentación animal data al siglo XVI con las demostraciones anatómicas de Vesalius, fundador de la anatomía moderna.

El mayor número de animales que se utilizan en la investigación experimental y en controles de calidad de medicamentos son ratones y ratas. Estadísticamente los ratones

son más del 60% del total, las ratas un 30 % y el resto corresponde a cobayos, hámster y conejos, y otras que se utilizan muy poco [37, 38].

La investigación basada en modelos animales en experimentación revela información importante y necesaria para diseñar pruebas humanas, que preceden para la aprobación legal de equipos y dispositivos tecnológicos, fármacos, procedimientos con índole terapéutico, diagnóstico, etc.

Además, es importante recalcar que el código ético detrás de la experimentación con modelos animales se vuelve una obligación. Según el Código de Nuremberg, cualquier experimento hecho en seres humanos "debe ser diseñado y basado en los resultados de investigación animal" [39].

La Declaración de Helsinki, adoptada en 1964 por la XIII Asamblea Médica Mundial y revisada en cinco ocasiones, cita también que la investigación médica en sujetos humanos "debe estar basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación con animales" [40].

En México, se cuenta con normativa que establece y vigila el cumplimiento de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; entre ellas la NOM-062-ZOO-1999, NOM-033-ZOO-1995 [41, 42].

## **11. Técnica histológica**

La técnica histológica consiste en el seguimiento de ciertos puntos ordenados que permiten preparar un tejido biológico con el fin de la observación de este a través de un microscopio. De acuerdo con el tipo de microscopio que será utilizado es como se lleva a cabo la preparación del tejido para su observación.

La técnica más común para preparar las muestras es la técnica histológica ordinaria o de inclusión en parafina. Las muestras son infiltradas en parafina, para obtener una consistencia adecuada al momento de crear los bloques con las muestras o especímenes.

Una vez que se tienen los cortes (Inclusión), se procede al corte de estos con la ayuda de un micrótopo ya que este ayuda a obtener cortes muy delgados (micrómetros de espesor),

dependiendo del micrótopo el espesor de los cortes puede variar lo que permite observar las estructuras celulares y tisulares [43].

### 11.1. Pasos de la técnica histológica



Diagrama 1. Pasos de la técnica histológica.

Obtención: Este paso no es considerado dentro de la técnica histológica, sin embargo, cualquier muestra a procesar primero debe obtenerse.

Fijación: Con este paso se evita la muerte celular y se conservan las proteínas de las células. La inmersión ocurre cuando la muestra es sumergida en el fijador y este penetra de manera paulatina de la periferia al centro de la muestra. el fijador más utilizado es el formol al 10% y el tiempo que la muestra debe permanecer en el de forma ideal es de 24 a 48 horas.

**Deshidratación:** Las células tienen agua en su interior, por lo que se tiene que deshidratar las muestras en alcohol a diferentes concentraciones. De esta forma el agua abandona de manera paulatina los tejidos y así el agua ha sido reemplazada con alcohol.

**Aclaración o difanización:** El alcohol se reemplaza con agentes aclarantes como el xileno, tolueno o benceno ya que son miscibles en parafina, en este paso la muestra también adquiere cierta transparencia.

**Infiltración e inclusión:** la infiltración se da cuando la parafina líquida penetra al interior de las células y de las estructuras tisulares y la inclusión ocurre cuando el tejido es embebido en la parafina, donde se forma el bloque.

**Corte o microtomía:** Cuando la parafina se ha solidificado y tiene una buena consistencia, el tejido está en condiciones ideales para cortarse. Un grosor estándar que las rebanadas de tejido deben tener para que la muestra permita el paso de luz del sistema óptico del microscopio estaría en un espesor de 5-10 micrómetros. Los cortes se obtienen con el microtomo, que es el instrumento que permite obtener estas rebanadas tan delgadas, aunque también dependiendo del microtomo el espesor de estas muestras puede variar.

**Desparafinización:** Se emplean agentes aclarantes para que reemplacen la parafina, dichos agentes confieren a la transparencia del corte y ayudan al proceso de tinción.

**Rehidratación:** Debido a que en el corte los espacios vacíos están ocupados por agente aclarante, en este paso nuestra muestra debe rehidratarse, esto ocurre mediante la inmersión en alcohol en concentraciones decrecientes, y por último en agua.

**Tinción:** En este punto los cortes son tan delgados que son transparentes, para lograr diferencias las estructuras del tejido. Los cortes pueden ser coloreados con tinciones monocromáticas, bicromáticas o tricromáticas.

**Montaje:** Una vez que el corte ha sido teñido, debe ser protegido para que se conserve. A cada corte se le coloca resina sintética (transparente) y un cubreobjetos [43].

## Planteamiento del problema

Si retomamos los principios de la propagación de la luz en medios turbios y la interacción en un medio como el tejido biológico (atenuador), se describen tres fenómenos: los fotones se absorben, los fotones se dispersan o los fotones se transmiten. Los fotones transmitidos representan la radiación no atenuada, aquella que atraviesa el tejido sin ser absorbida o dispersa [44]. En cuanto a los fotones dispersos, esta radiación prevalece a pesar de la interacción con el tejido y puede propagarse en direcciones similares a las de incidencia.

Entonces, aunque ya se han determinado los coeficientes de absorción y dispersión en experimentos anteriores, no ha sido con geometría de haz estrecho, existen algunos dispositivos y técnicas para calcular los valores de las propiedades de la luz. Sin embargo, estos dispositivos permiten la detección de todos los fotones sin hacer una discriminación física de estos, recurriendo a la discriminación solo mediante algoritmos de reconstrucción por lo que los valores de estos coeficientes (absorción y dispersión) varían hasta 3 órdenes de magnitud según las referencias consultadas [20, 21, 24, 45].

Lo anterior debido a que no se discriminan de manera adecuada los fotones dispersos, y que son detectados durante las mediciones de dichos coeficientes, por lo que no se tiene la certeza de cuales valores son los correctos. Por otro lado, tampoco se han determinado los valores de los mismos coeficientes abarcando el espectro de 405 a 980 nm como fuente de luz.

Lo mencionado impacta en las técnicas de terapia y diagnóstico ópticos; en la primera que involucra la dosimetría óptica, por ejemplo, con los datos disponibles actualmente no se tiene la certeza de que cantidad de luz se requiere para realizar una terapia fotodinámica, etc. En la segunda, en el diagnóstico óptico no se pueden corregir las imágenes de tomografía óptica de manera adecuada porque no se conoce con buena aproximación el número de fotones ópticos balísticos (fotones transmitidos) y dispersos que forman una imagen debido a la diferencia de los valores de estos coeficientes en estudios experimentales previos. Por lo anterior y en la búsqueda de homogenización de la caracterización de la luz, se abordará un modelo físico que permita reducir este problema y obtener medidas más confiables de dichos coeficientes. En este proyecto se plantea diseñar, construir y validar un dispositivo basado en el concepto de la geometría de haz estrecho que permita cuantificar correctamente la magnitud de los coeficientes de

atenuación y dispersión en tejido biológico murino y disminuir y/o anular la detección de fotones dispersos.

## Justificación

Actualmente los métodos ópticos para realizar investigación, diagnóstico y tratamiento/terapia en la medicina han incrementado su aplicación durante los últimos años [46, 47, 48, 49]. Dentro de las técnicas ópticas para generar imágenes superficiales de tejidos se encuentran la tomografía óptica difusa (DOT) [50, 51, 52, 53], la tomografía óptica coherente (OCT) [54, 55, 56] y la fotopletismografía de imágenes (PPGI) [57, 58, 59]. Dentro de las técnicas terapéuticas, la terapia fototérmica [60, 61, 62, 63] y la terapia fotodinámica [64, 65] que se fundamentan en la absorción de la luz en los tejidos.

Podemos definir que la importancia de estas técnicas y su desarrollo novedoso es importante, primero, porque la mayoría de las técnicas de imagen y terapia usadas en la actualidad son de origen radiación ionizante; lo que sugiere una ventaja de las técnicas ópticas sobre las tradicionales (Tomografía Computarizada, Rayos X, etc.), segundo, por el costo elevado en el que se incurre al implementar las técnicas tradicionales de diagnóstico y tratamientos en cuestión con estos equipos médicos e insumos para estos, tercero, por las características ópticas de los tejidos con la luz, de los 780 – 1550 nm (ventana terapéutica o de diagnóstico) [66, 67], como la transparencia a la radiación, donde la absorción es mínima en la mayor parte de los tejidos. Adicionalmente, este ancho de banda de excitación disminuye la dispersión [67]. En la actualidad se utilizan arreglos ópticos experimentales complejos y algoritmos de reconstrucción para aislar la información de interés.

La motivación de esta investigación es el desarrollo de una técnica nueva y menos compleja con geometría de haz estrecho para la discriminación de la radiación dispersa como respuesta a las preocupaciones antes mencionadas. De este modo, incrementar el desarrollo de las técnicas ópticas como técnicas no invasivas, impulsando la migración de las técnicas tradicionales, junto con el costo que conllevan usarlas en la formación de imágenes.

## **Hipótesis**

Es posible discriminar la radiación dispersa de fotones con geometría de haz estrecho y determinar el coeficiente de atenuación lineal de la luz mediante la cuantificación de fotones balísticos.

## **Meta de Ingeniería**

Diseñar y desarrollar un dispositivo basado en la geometría de haz estrecho que permita determinar los coeficientes de atenuación lineal de la luz en tejido biológico tomando en cuenta la distancia que debe existir entre la fuente de luz y el detector obedeciendo diferentes cálculos matemáticos obtenidos en este proyecto.

## **Objetivo General**

Diseñar, construir y validar un dispositivo para determinar el coeficiente de atenuación lineal utilizando geometría de haz estrecho en muestras biológicas murinas.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar las dimensiones del dispositivo, que cumplan con las especificaciones de geometría de haz estrecho a partir de la atenuación del haz de luz con la distancia recorrida y divergencia angular del haz.
2. Diseñar un dispositivo con el software de diseño mecánico SolidWorks ® que cumpla con las especificaciones de geometría de haz estrecho.
3. Seleccionar el material para construir el dispositivo, siendo este un material comercial, económico, de superficie porosa y rígida.
4. Seleccionar el color y la composición de la pintura que recubra el interior del dispositivo, que tenga una absorción de luz de al menos 90%.
5. Ensamblar la estructura verificando que cumpla con los requerimientos de haz estrecho planteados en el diseño.
6. Obtener los cortes de las muestras biológicas a partir de ratones de la cepa CD1, con ayuda de un micrótopo con distintos grosores.
7. Validar el dispositivo, obteniendo el valor de la transmitancia de las diferentes muestras de tejido.
8. Determinar el coeficiente de atenuación lineal en base en la ley de atenuación exponencial con las mediciones obtenidas.

## Metodología

En este capítulo se plantean 4 etapas, en la primera el proceso de diseño del dispositivo que cumplió con los criterios de geometría de haz estrecho. La segunda etapa correspondió a los elementos para la construcción e instalación del dispositivo. La tercera las pruebas y ensayos para validación del dispositivo y la última corresponde al procesamiento de los datos obtenidos.

En este capítulo nos referiremos a **dispositivo** como la construcción de la geometría de haz estrecho y a **sistema** como el conjunto del dispositivo de geometría de haz estrecho, la fuente de luz (láser) y el detector (espectrofotómetro).

### 1. Diseño del dispositivo (geometría de haz estrecho).

La geometría de haz estrecho vista en el capítulo de marco teórico cumplió con ciertas características importantes que se dividió en las siguientes etapas:

Se seleccionaron los elementos necesarios para la validación del dispositivo (la fuente de luz, el detector y las muestras del modelo animal) con estas dimensiones y especificaciones se consideraron las características físicas del dispositivo.

Las dimensiones de la geometría de haz estrecho también se basaron en cálculos teóricos sobre el ángulo sólido y ángulo plano, así como la divergencia del haz, para que las dimensiones del dispositivo y sus características no permitieran que los fotones dispersos llegaran al detector, es decir, que la radiación dispersa captada en el detector sea casi nula.

Se seleccionaron los materiales con las propiedades mecánicas, físicas y ópticas óptimas para la construcción del dispositivo. Se buscaron materiales económicos y de fácil manejo.

### 1.1. Elección de componentes para validar el dispositivo

El arreglo experimental necesario requirió tres elementos primordiales además del dispositivo con geometría de haz estrecho: una fuente de luz (láser), un detector (espectrofotómetro) y la muestra biológica.

#### 1.1.1. Láseres para validación experimental.

Considerando las preocupaciones del planteamiento del problema se determinó utilizar láseres que comprenden desde los 405 nm a los 980 nm de la marca ThorLabs para nuestra fuente de luz (ver tabla 3). Estos módulos láser funcionan en modo de potencia constante, con retroalimentación de un fotodiodo interno que se utilizó para mantener la potencia de salida óptica. Además, tiene una forma de haz de salida que es elíptica o redonda [68]. Cada módulo requiere una fuente de alimentación de 5 V de corriente directa.

**Tabla 3. En la siguiente tabla se exponen las características más importantes con base en la longitud de onda de los láseres a usar en este experimento [69].**

<b>Longitud de onda</b>	<b>Dimensiones del haz</b>	<b>Potencia de salida óptica (CW)</b>	<b>Divergencia del haz *</b>	<b>Dimensiones de la carcasa</b>
<b>405nm</b>	elíptica, 3.8 mm x 1.8 mm	4.5mW	0.8 mrad	Ø11.0 mm x 40 mm
<b>450nm</b>	elíptica, 3.2 mm x 1 mm	4.5 mW	1.5 mrad	Ø11.0 mm x 40.0 mm
<b>532nm</b>	elíptica, 4.6 mm x 1.7 mm	4.5 mW	0.5 mrad	Ø11.0 mm x 72.8 mm
<b>635nm</b>	circular, Ø2.9 mm	1.2 mW	0.6 mrad	Ø11.0 mm x 58.0 mm
<b>780nm</b>	elíptica, 3.8 mm x 1.6 mm	2.5 mW	1.6 mrad	Ø8.0 mm x 30.0 mm
<b>850nm</b>	elíptica, 4.5 mm x 1.2 mm	3.5 mW	1.5 mrad	Ø11.0 mm x 40.0 mm
<b>980nm</b>	elíptica, 3.8 mm x 1.8 mm	4.5 mW	1.5 mrad	Ø11.0 mm x 40.0 mm

\* Divergencia de ángulo completo, ancho de haz  $\frac{1}{e^2}$

*Detector: espectrofotómetro*

Se consideró un detector de luz, en este caso un espectrofotómetro, con la capacidad de captar todas las longitudes de onda de los láseres mencionados, con alta precisión en la cuantificación.

El espectrómetro que se usó en este experimento fue el BLUE-Wave Miniature Spectrometer de StellarNet Inc® (véase Fig. 13), es un instrumento capaz de detectar longitudes de onda en el rango de 200 a 1050 nm [36].

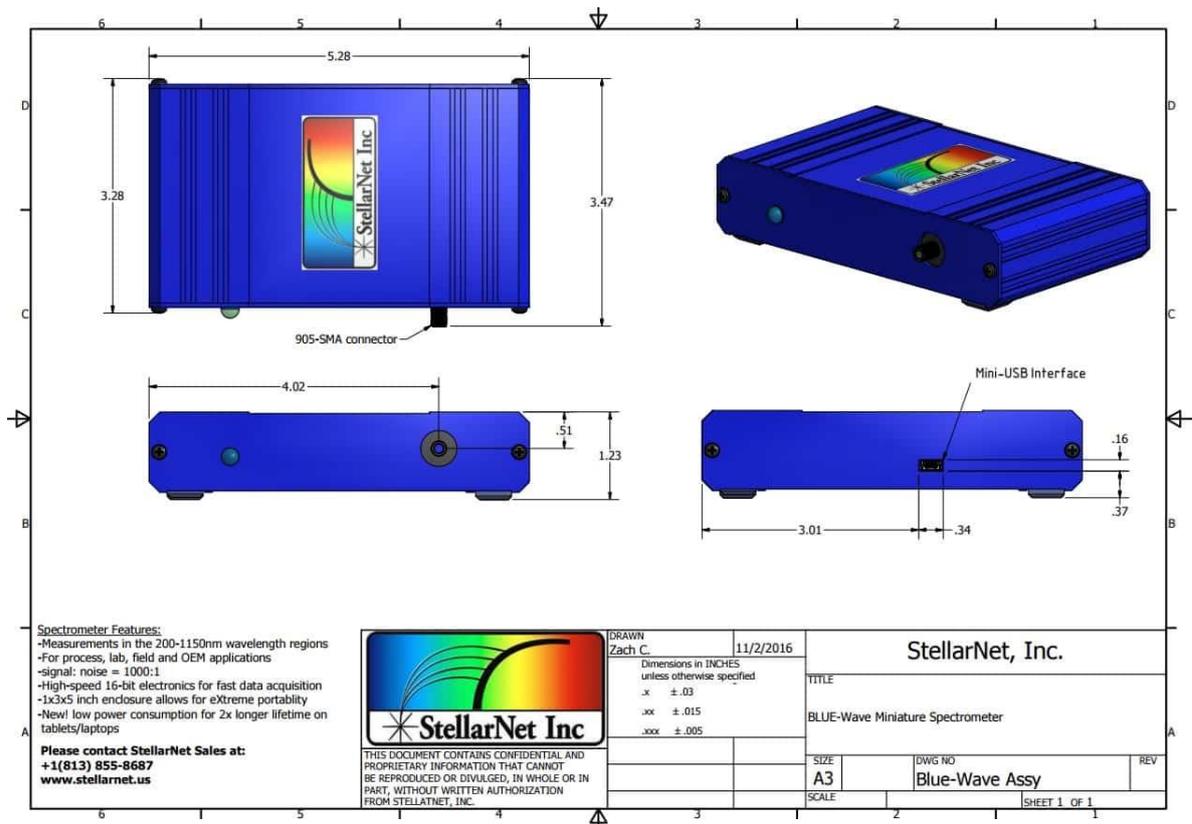


Figura 13. BLUE-Wave espectrómetro de StellarNet Inc®.

1.1.2. Muestras del modelo animal

En este punto para el diseño y dimensiones del dispositivo solo es importante considerar que un portaobjetos convencional tiene dimensiones de entre 7.5 cm de alto y 2.5 cm de ancho.

Para manipular la distancia de la muestra histológica entre la fuente de luz y el detector se propuso agregar al dispositivo un riel que permita llevar un soporte el cual nos ayudó a sujetar el portaobjetos y cambiar la distancia; tomando en cuenta este acoplo de

componentes, se consideró que el portaobjetos tendría una altura de más 1.8 cm respecto al nivel de la base del dispositivo al incorporar estos componentes (véase Fig. 27 y 28).

### 1.2. Dimensiones del diseño basados en la teoría.

Para las dimensiones del diseño, se deberá tomar en cuenta la distancia que debe existir entre la fuente de luz (laser) y el detector (espectrofotómetro) obedeciendo que:

**“Límite de error fotones dispersos que se puedan detectar sea menor que el 3% de acuerdo con el ángulo sólido y ángulo plano”**

Siguiendo el punto 8.2 del marco teórico sobre el ángulo plano, suponiendo que el centro de origen de una esfera parte en el láser y termina en el punto del espectrofotómetro.

Retomando la ecuación 13,

$$\alpha = \frac{S_1}{R_1} = \frac{S_2}{R_2}$$
$$\alpha = \frac{S_1}{R_1}$$

Tomando como condición inicial que los fotones dispersos no deben ser mayor al 3% entonces,

$$\alpha = 0.03$$

Se desconoce el valor de  $S_2$ , sin embargo, este valor también se puede representar como el área del círculo reflejado ( $A_{ref}$ ), tomando en cuenta que la entrada del espectrofotómetro tiene un diámetro de 0.5 cm podemos decir (véase Fig. 14),

$$S_2 = A_{ref} = \pi r^2 \quad \text{Ecuación 14}$$

$$S_2 = \pi(0.25)^2$$

$$S_2 = 0.1963 \text{ cm}^2$$

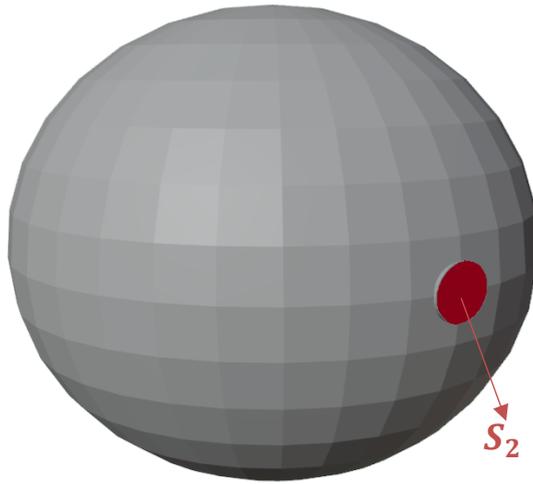


Figura 14. Representación visual para  $S_2$ .

$R_2$  también se desconoce, pero siguiendo el método para calcular  $S_2$  tomando el área del círculo como la distancia entre el detector y la fuente de luz ( $A_{esf}$ ) y despejando nuestro valor de  $r$  entonces, para calcular  $R_2$  (véase Fig. 15),

$$A_{esf} = \pi R_2^2 \quad \text{Ecuación 15}$$

$$\alpha = \frac{S_2}{A_{esf}}, \alpha = \frac{S_2}{\pi R_2^2} \quad \text{Ecuación 16}$$

$$R_2 = \sqrt{\frac{S_2}{(\pi)(\Omega)}} \quad \text{Ecuación 17}$$

$$R_2 = \sqrt{\frac{0.1963}{(3.1416)(0.03)}}, \quad R_2 = \pm \sqrt{\frac{0.1963}{(3.1416)(0.03)}} = \pm \sqrt{\frac{0.1963}{0.094248}}$$

$$R_2 = \pm \sqrt{2.0828} = 1.443 \text{ cm (Se toma el valor positivo)}$$

$\therefore R_2 \geq 1.443 \text{ cm}$  Con esto se asegura que la contribución (si es el caso) no excederá el 3% a la medida de la cantidad de luz que llegará al detector

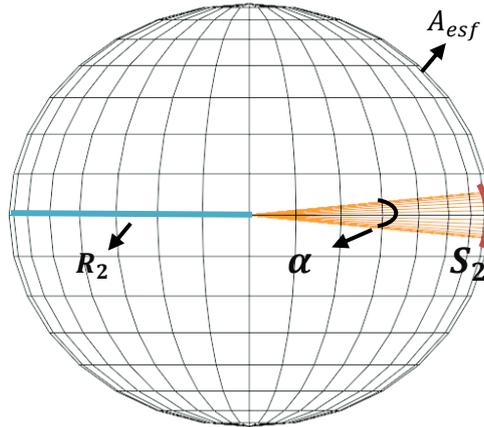


Figura 15. Representación visual para  $R_2$ ,  $\alpha$ ,  $S_2$  y para el valor de  $A_{esf}$ .

Tomando un radio de la distancia que existe entre la fuente de luz y el detector igual a 30 cm, entonces tenemos que,

$$r = 30 \text{ cm}, S_2 = 0.1963 \text{ y } R_2 = A_{esf} = \pi r^2$$

Sustituyendo en la ecuación 13,

$$\alpha = \frac{S_2}{R_2}$$

$$\alpha = \frac{0.1963}{(\pi)(30)^2}$$

$$\alpha = 0.00006$$

Por lo tanto, para una distancia de 30 cm los fotones dispersos representan el 0.06%.

Por tanto  $3\% > 0.06\%$ , entonces si el dispositivo tiene un largo de 30 cm el ángulo divergente de la luz no debe ser mayor al 0.06% de la esfera para mantener la pérdida de luz por debajo del 3%. Tomando 30 cm de radio según la fórmula del área de una esfera,

$$A = 4\pi r^2 \quad \text{Ecuación 18}$$

$$A = 4\pi(30)^2 = 11309.73 \text{ cm}^2$$

Calculando el 0.06% de A obtenemos  $0.6786 \text{ cm}^2$

Calculando el diámetro considerando que es un círculo plano,

$$A_{cir} = \pi r^2 \quad \text{Ecuación 19}$$

Por tanto, el diámetro del círculo resultante es igual a 0.92 cm (véase Fig. 16).

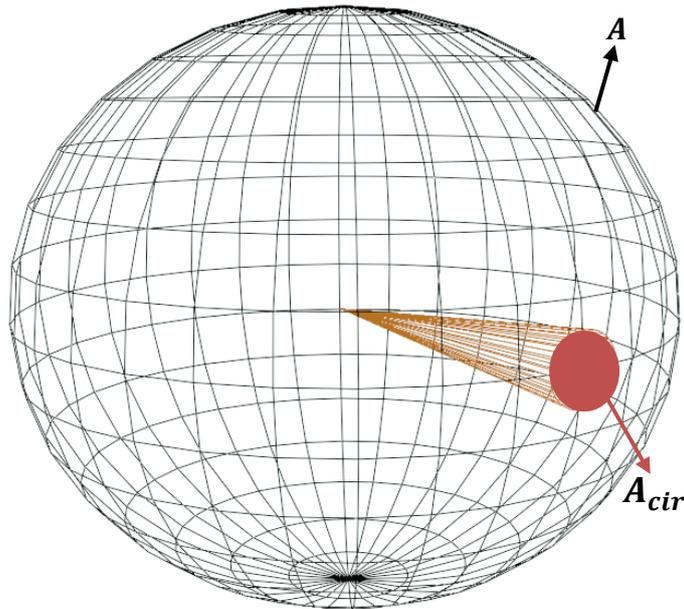


Figura 16. Representación visual para A y para nuestro cálculo de  $A_{cir}$ .

Tomando en cuenta la divergencia del haz para el primer y último láser, siendo estas las longitudes de onda de menor y mayor valor, según la tabla 3 tenemos que la divergencia menor y la divergencia mayor son de 0.8 mrad y 1.6 mrad respectivamente.

Calculando la longitud del arco respecto a la divergencia de los láseres,

$$\Delta\theta_1 = 0.000440 \text{ cm}$$

$$\Delta\theta_2 = 0.00088 \text{ cm}$$

Ambos valores están por debajo del 0.92 cm, que según los cálculos mantienen la dispersión de luz por debajo del 3%, por lo que podemos decir que ambas funciones se cumplen.

De acuerdo con los datos obtenidos en los cálculos anteriores, se determinó que las dimensiones del dispositivo para el largo de este son de 30 cm entre la fuente de luz y el detector, esto nos permitió ajustar la distancia de la muestra respecto al detector de acuerdo con las necesidades de cada prueba.

Se estableció un ancho y altura de la caja de acuerdo con los 7.5 cm del portaobjetos y el 1.8 cm extra del sistema de riel, por lo que se construyó una cara cuadrada de 12 cm, con el fin de tener espacio para la maniobrabilidad de las muestras. Tomando en cuenta las dimensiones extra de la altura del riel, la altura desde la base del portaobjetos hasta el haz del láser es de 4.2 cm. Esto se tomó en cuenta para colocar la muestra histológica a 4.2cm del borde del portaobjetos.

También se le agregó al sistema, entendiendo al sistema como al conjunto del dispositivo de geometría de haz estrecho, el detector y los láseres una altura agregada de 8cm con el nivel de la mesa óptica debido a que los láseres cuentan con un kit de instalación para su sujeción, donde la altura mínima que puede tener el kit es de 6 cm.

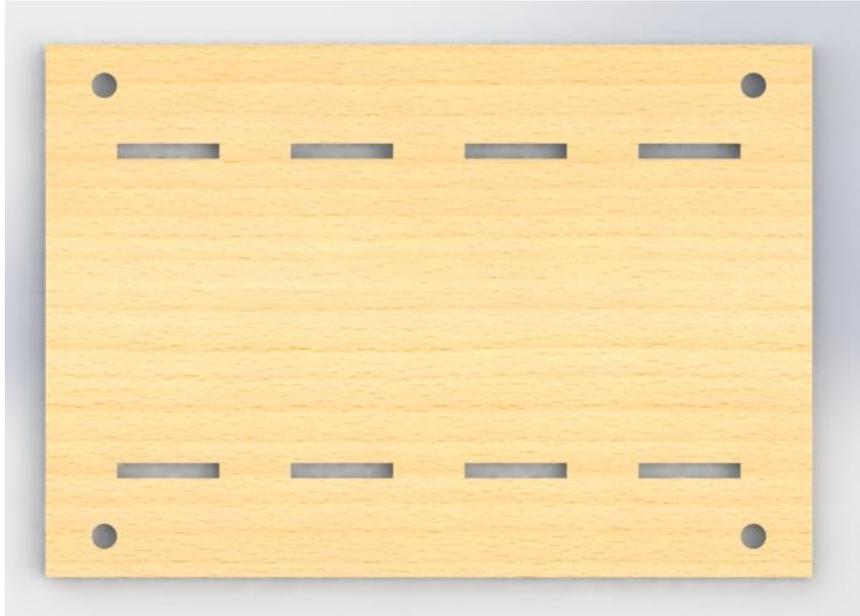
### 1.3. Diseño tridimensional

Previamente a la construcción se verificaron las dimensiones de todos los elementos del sistema a través de un software tridimensional, donde se corrigieron las dimensiones del dispositivo hasta que este cumplió con las características requeridas.

Se simularon las dimensiones y los mecanismos del dispositivo en el software SolidWorks®, este es un programa de diseño asistido por computadora para modelado mecánico 2D y 3D desarrollado en la actualidad por SolidWorks Corp.® [70]. Se trabajó con la versión de SolidWorks 2020, la licencia del software fue proporcionada por la Universidad Autónoma del Estado de México y se utilizó el programa en una computadora con Windows 10 de 64 bits con un procesador AMD 12.

A continuación, se presentan todas las piezas que conforman el dispositivo con geometría de haz estrecho con una descripción de cada pieza. En el apartado de anexos se encuentran los planos de cada una de las piezas diseñadas.

- Base de anclaje: esta base nos brindó el soporte necesario para mantener todo el dispositivo inmóvil, con ayuda de 8 anclajes distribuidos en dos de las caras del dispositivo; a su vez es la pieza encargada de anclar el dispositivo a la mesa óptica, con ayuda de 4 orificios en los extremos de esta con dimensiones  $\Theta \frac{1}{4}$  In (véase Fig. 17, ver anexo 1).



*Figura 17. Vista superior de la base de anclaje.*

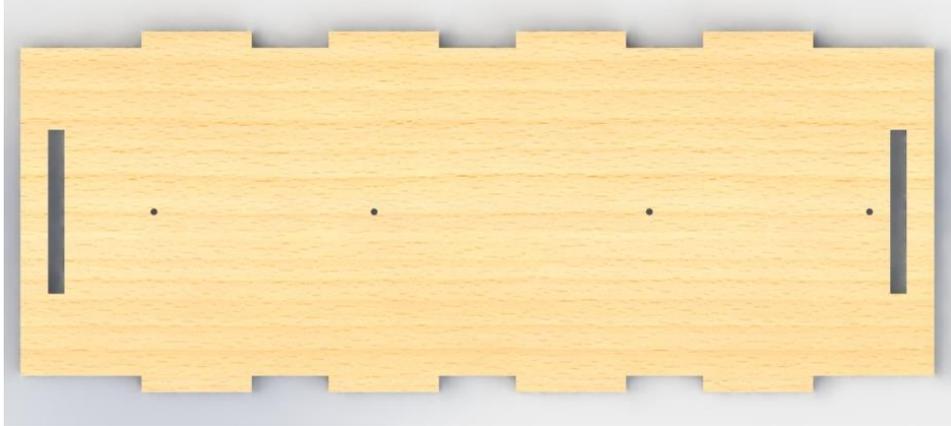
- Caras laterales del dispositivo (x2): Las pestañas inferiores de estas caras nos permitieron anclar el dispositivo en la base de anclaje, otra función es que agrego una altura de 8cm al dispositivo de acuerdo con las especificaciones requeridas con el kit de instalación del láser. Esta misma pieza se ajusta con los anclajes de la base del dispositivo, la cara anterior (entrada de la fuente de luz) y la cara posterior (entrada del detector) (véase Fig. 18, ver anexo 1).



*Figura 18. Vista superior de las caras laterales del dispositivo.*

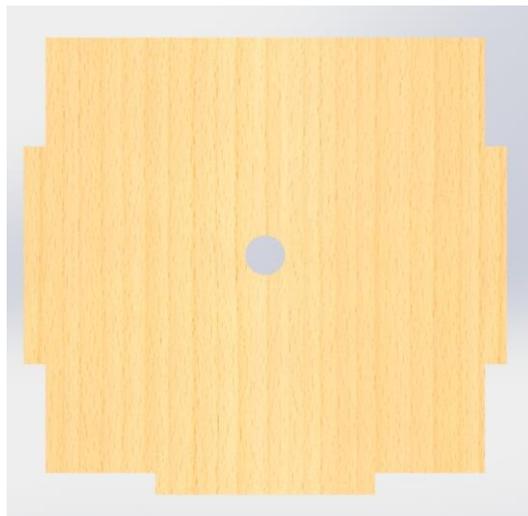
- Base del dispositivo: En esta base es donde se anclaron las 4 caras del dispositivo, también es donde se acoplo el riel para lograr cambiar la distancia del

portaobjetos, con ayuda de cuatro orificios de  $\varnothing 2\text{mm}$ ; esta pieza fue segmentada dada 5mm para conocer la distancia entre el portaobjetos y la fuente de luz (véase Fig. 19, ver anexo 1).



*Figura 19. Vista superior de la base del dispositivo.*

- Cara anterior (entrada de la fuente de luz): Esta cara nos permitió acoplar la fuente de luz, en este caso, el láser dejando un orificio centrado de  $\varnothing 11\text{mm}$ . (véase Fig. 20, ver anexo 1); De acuerdo con la tabla 3, existen dos medidas del diámetro de los láseres, por lo que se añadió un aditamento para acoplar los distintos láseres (véase Fig. 21, ver anexo 1); en la tabla 3 también encontramos que las dimensiones del haz de luz entre cada láser son diferentes, por lo que se propuso colimar la luz a un diámetro de 0.25mm (véase Fig. 22, ver anexo 1).



*Figura 20. Vista superior de la cara anterior (entrada de la fuente de luz).*

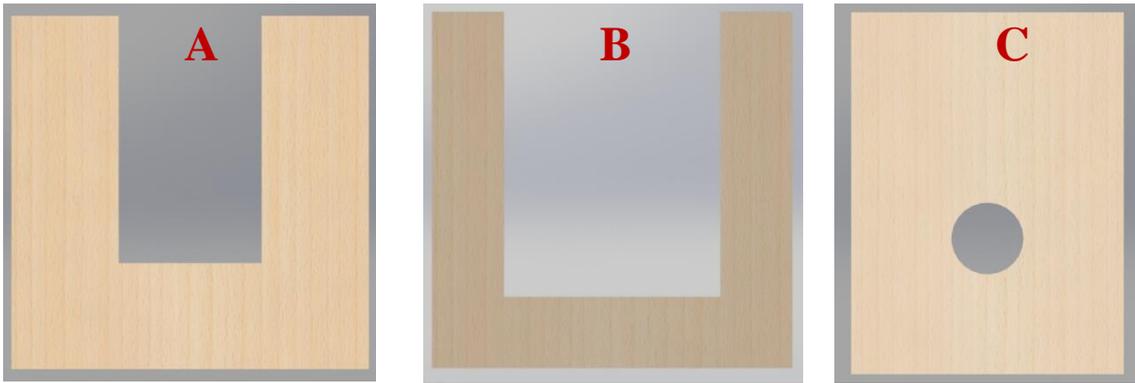


Figura 21. Mientras que a y b funcionan como anclaje para la pieza c, la pieza c nos permitió acoplar el láser con el diámetro más pequeño al dispositivo.

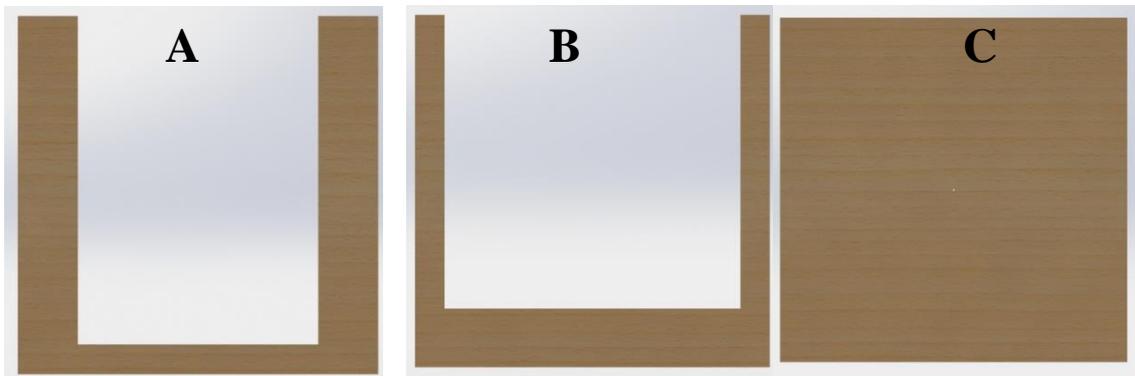


Figura 22. Mientras que a y b funcionan como anclaje para la pieza c, la pieza c nos permitió colimar la entrada del haz de luz de cada láser a 0.25mm.

- Cara posterior (entrada del detector): Esta última cara nos permitió acoplar el detector (espectrofotómetro) al dispositivo, el diámetro de la entrada del detector es de  $\Theta$  6mm (véase Fig. 23, ver anexo 1).

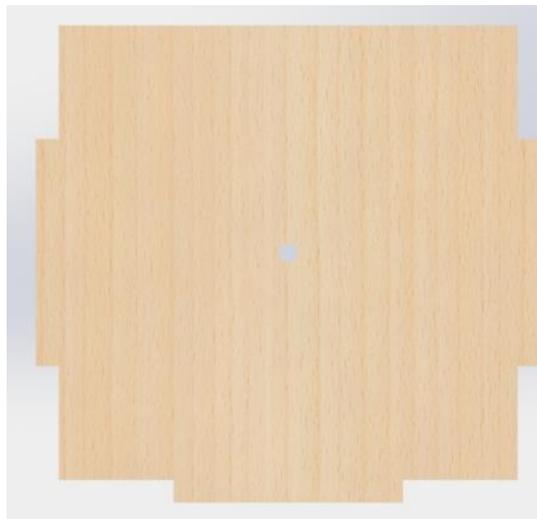
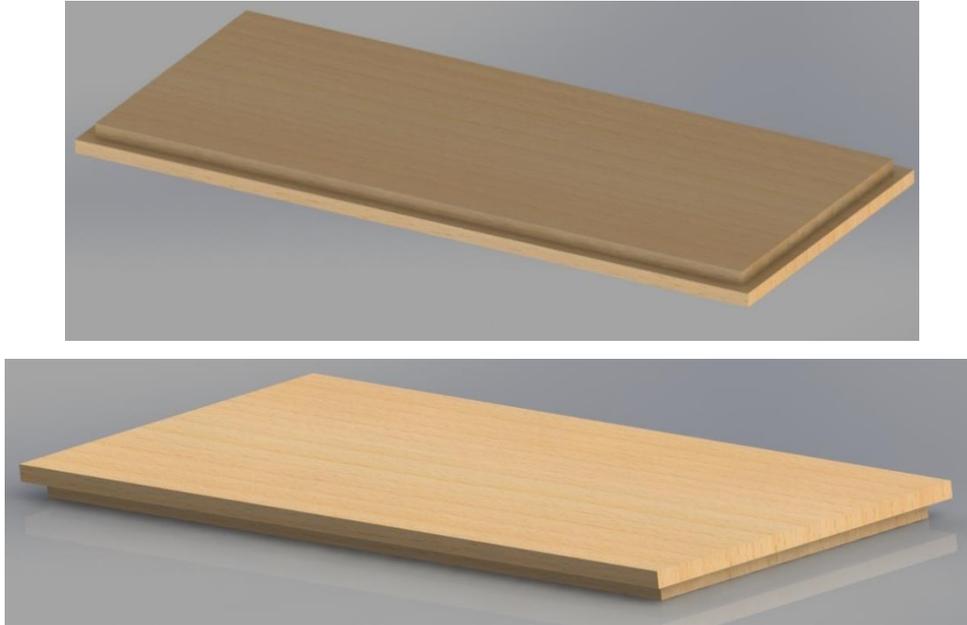


Figura 23. Vista superior de la cara posterior (entrada del detector).

- Tapa del dispositivo: El cambio constante de las muestras histológicas con las que se llevó a cabo el estudio impidió que el dispositivo estuviera completamente sellado, por lo que se diseñó una tapa en la parte superior, de acuerdo con su diseño este limitó el paso de la luz (véase Fig. 24, ver anexo 1).



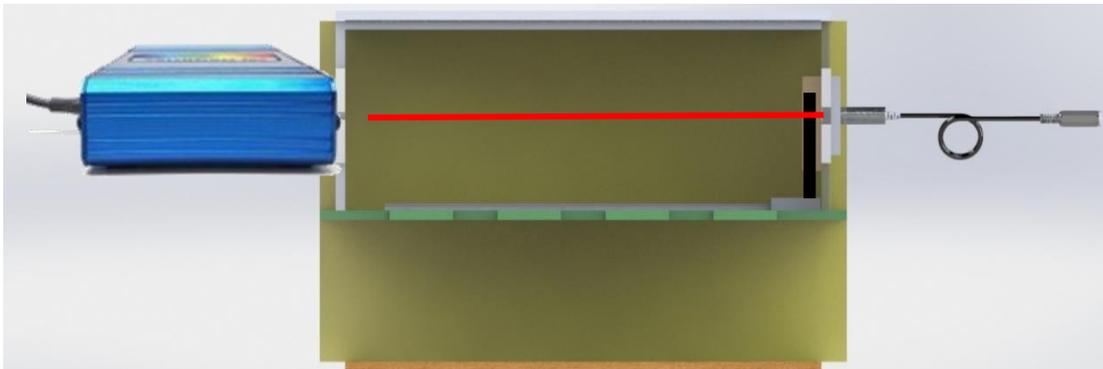
*Figura 24. Vista isometría de la tapa del dispositivo.*

Una vez concluido el diseño de todos los elementos del dispositivo, se procedió a realizar el ensamble de estos mediante la relación de posiciones de los anclajes de cada pieza con ayuda del software SolidWorks® (véase Fig. 25, ver anexo 2).



*Figura 25. Ensamble final del diseño conceptual del dispositivo.*

A continuación, la figura 26 muestra una vista preliminar del sistema, basándonos en el diseño del dispositivo con los demás elementos que lo complementan: fuente de luz y detector.



*Figura 26. Imagen conceptual del sistema basados en el diseño del dispositivo, vista lateral.*

## **2. Elementos para la construcción del dispositivo.**

En la construcción del dispositivo se buscó un material económico, fácil de manipular y con aislamiento óptico.

## 2.1. Materiales para la construcción del dispositivo

### 2.1.1. Carcasa: MDF.

El tablero de fibra de densidad media (MDF), presenta una estructura uniforme y homogénea y una textura fina que permite que sus caras y cantos tengan un acabado perfecto; es un material ideal para ser usado en la industria del mueble y en la construcción; la superficie del MDF es apta para ser cubierta con pintura, melamina, chapa natural u otros solventes para dar acabados, además de que presenta un mejor aprovechamiento de estos, lo cual las hace fácil de pintar, laquear y barnizar [71].

Otra importante característica de este material es su excelente propiedad de aislamiento térmico, acústico y de luminosidad. La superficie sin imperfecciones ayuda a un fácil aislamiento entre esquinas y también permite un pintado liso [72].

### 2.1.2. Recubrimiento de la carcasa: pintura.

El negro es el mejor "absorbedor" de calor. Absorbe toda la luz del espectro visual. Como resultado de absorber todas las ondas de luz, por lo que lo convierte en el color de la pintura que cumple con los requerimientos del dispositivo [73].

Para pintar el dispositivo se usó pintura en aerosol color negro mate marca Alvamex y pintura en aerosol marca IPESA color negro mate.

### 2.1.3. Riel de apoyo.

Se incorporó un riel de aluminio de 27.5 cm de largo que nos permitió cambiar la distancia que pueda existir entre la muestra y el láser, de esta forma podemos evaluar cómo afecta la distancia en la dispersión de la luz (véase Fig. 27). Sobre el riel se añadió un clip ajustable para sujetar el portaobjetos (véase Fig. 28).



*Figura 27. Riel incorporado al sistema que permite cambiar la distancia del portaobjetos y el láser.*

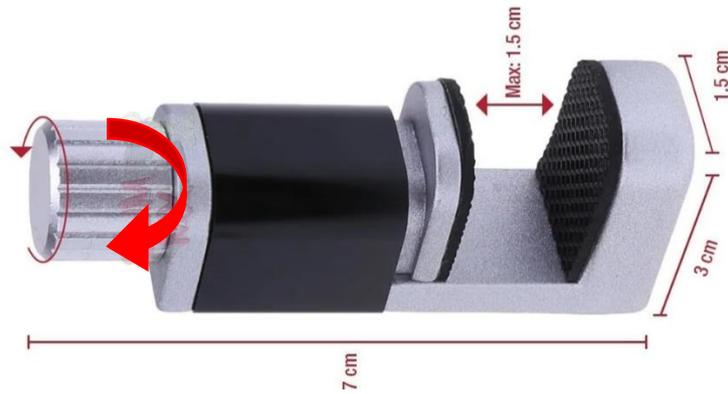


Figura 28. Clip ajustable incorporado en el riel para sujetar el portaobjetos. Imagen tomada de [74].

## 2.2. Elementos para la instalación del sistema.

### 2.2.1. Mesa de instalación.

Una mesa óptica con aislamiento activo de vibraciones de la marca Thorlabs, esta contiene un sistema de aislamiento que aísla eficazmente la mesa óptica de las vibraciones verticales y horizontales en todo el rango de frecuencia crítica de 3 a 50 Hz [75]. En esta mesa se acoplaron los elementos del sistema ya que cuenta con ranuras circulares de  $\varnothing$   $\frac{1}{4}$  In cada pulgada (véase Fig. 29).

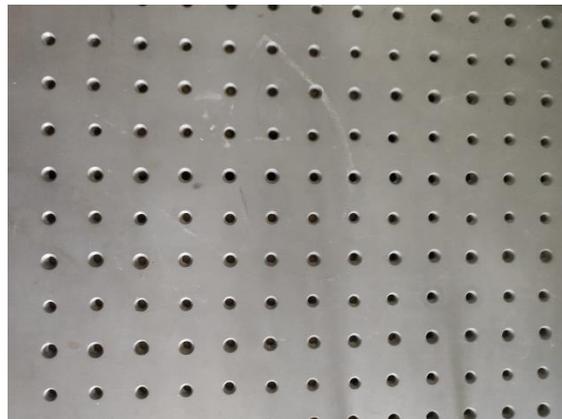


Figura 29. Superficie de la mesa óptica donde se instaló todo el sistema.

### 2.2.2. Instalación del láser.

Los láseres cuentan con un kit de instalación con todos los componentes necesarios, estos se montaron a través de tornillos fijadores a la mesa óptica y a su vez el kit alimenta los módulos láser, una fuente de alimentación con un voltaje de línea seleccionable de 115 V

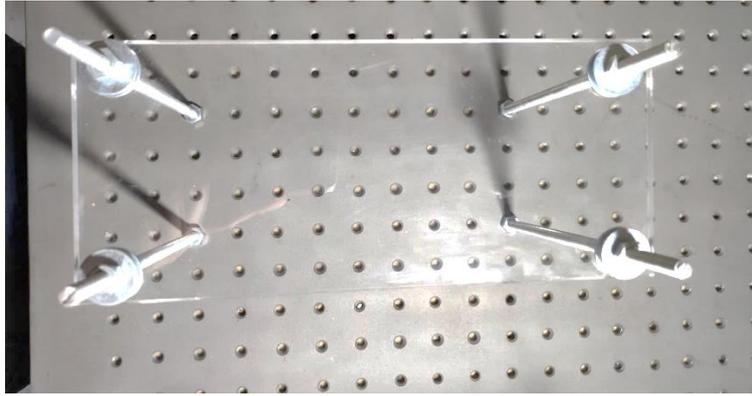
o 230 V [69], un cable de alimentación específico para la ubicación y una llave hexagonal con la que se ajusta el láser al kit de instalación, así como la altura del kit (véase Fig. 30).



*Figura 30. Kit de instalación para montaje del láser sobre mesa óptica. Altura ajustada a 8cm, se logra observar los tornillos fijadores para la mesa óptica.*

### 2.2.3. Base del espectrofotómetro.

Para lograr alcanzar la altura del dispositivo y del láser se construyó una base para el espectrofotómetro de acrílico grosor 6mm por su rigidez [76, 77], con 23.08 cm de largo y 10 cm de ancho que se instaló a la mesa óptica a través de varillas roscadas de acero galvanizada de  $\Theta \frac{1}{4}$  In y 20 cm de alto para obtener la altura necesaria del espectrofotómetro, con ayuda de 12 tuercas y 8 rondanas para evitar el movimiento de esta (véase Fig. 31).



*Figura 31. Base de acrílico para el espectrofotómetro instalada en la mesa óptica.*

#### 2.2.4. Instalación del dispositivo.

Para la instalación del dispositivo a la mesa se utilizaron 4 varillas roscadas de acero galvanizada de  $\varnothing \frac{1}{4}$  In y 5 cm de alto (véase Fig. 32), con ayuda de 4 tuercas se evitó el movimiento del dispositivo.



*Figura 32. Varillas roscadas de acero galvanizada de  $\varnothing \frac{1}{4}$  In y 5cm de alto.*

### 3. Validación del dispositivo.

Para la validación o caracterización del sistema se utilizaron muestras de tejido murino de 10 diferentes grosores, así como los 7 láseres descritos anteriormente.

Para cada laser se evaluaron las 10 diferentes muestras, tomando 5 señales/ensayos de cada una de las muestras con el fin obtener un porcentaje de error y analizar la reproducibilidad de la prueba (ver tabla 4).

**Tabla 4. Por cada muestra histológica (por cada corte) se registraron 5 señales, y en cada longitud de onda se evaluaron las 10 distintas muestras histológicas.**

	laser (405nm)	laser (450nm)	laser (532nm)	laser (635nm)	laser (780nm)	laser (850nm)	laser (980nm)
3 $\mu$ m	5 señales de fotones transmitidos para cada muestra y longitud de onda						
5 $\mu$ m							
7 $\mu$ m							
10 $\mu$ m							
12 $\mu$ m							
16 $\mu$ m							
20 $\mu$ m							
25 $\mu$ m							
30 $\mu$ m							
35 $\mu$ m							

### 3.1 Modelo Animal para validación.

Este trabajo de experimentación se realizó con muestras histológicas, controles obtenidos en la Facultad de Medicina, estas fueron extraídas de ratones macho de la cepa CD1, sanos de 12 semanas de edad al momento del sacrificio y la obtención de las muestras.

Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) campus Xochimilco. Se mantuvieron en condiciones estándares de un bioterio, con un ciclo de luz y oscuridad 12:12 y una temperatura de  $21 \pm 2$  °C con libre acceso a una dieta normal estándar y agua [78].

### 3.2 Obtención de las muestras histológicas.

Se obtuvieron diez distintos espesores de 3  $\mu$ m a 35  $\mu$ m. Para realizar las secciones histológicas del tejido murino, hígado, se empleó un micrótopo rotatorio manual marca Leica Jung 820, las secciones obtenidas fueron adheridas al centro de los portaobjetos.

A continuación se muestra un diagrama de flujo del proceso histológico que se llevó a cabo para la obtención de las muestras, cabe mencionar que para utilidad de este proyecto no es necesario llevar a cabo todo el proceso histológico debido a que el objetivo de este proyecto no es observar la muestra, sino determinar la cantidad de fotones que son capaces de atravesarla, por lo que se describen los pasos que se llevaron a cabo

únicamente para este proyecto; dichas muestras fueron obtenidas por personal de la facultad de Medicina, totalmente capacitado para realizar esta tarea.

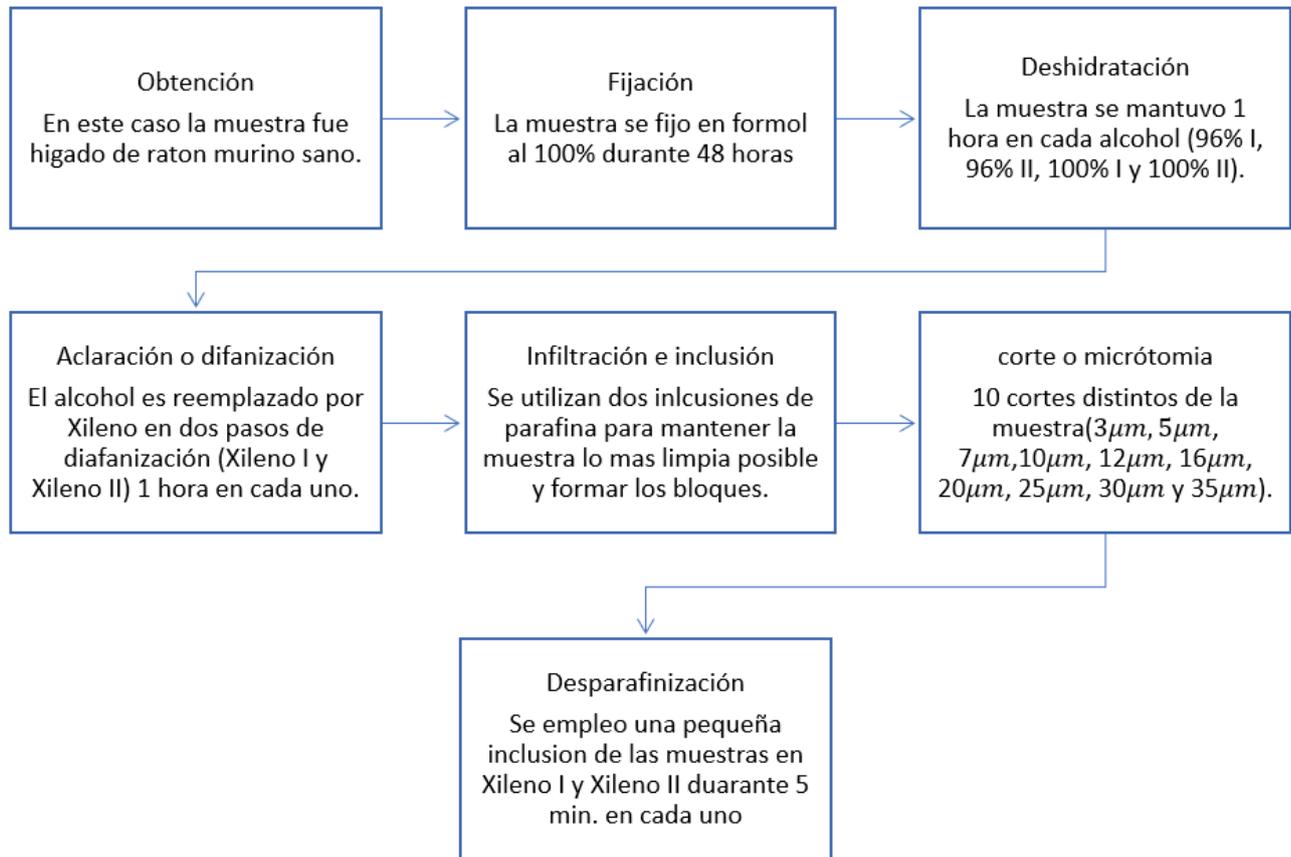


Diagrama 2. Seguimiento del método de corte histológico para este proyecto.

### 3.3 Ensayos.

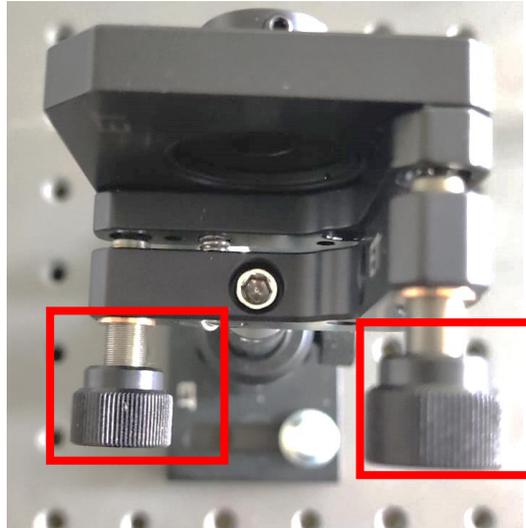
Concluida la instalación del dispositivo y demás elementos del sistema en el laboratorio.

El primer paso fue la alineación y ajuste de los láseres.

Con ayuda del kit de instalación para el montaje del láser, gracias a sus perillas de ajuste es como se logró alinear la salida del láser para llegar directamente al centro del espectrofotómetro (véase Fig. 33).

El ojo humano es capaz de ver aproximadamente longitudes de onda hasta los 750 nm por lo que hasta el láser de longitud de onda de 780 nm el ajuste se realizó sin dificultades, para el resto de los láseres se hizo uso de la cámara del celular para poder visualizarlo y

alinearlo a la entrada del espectrofotómetro, ya que a través del celular se logró observar la radiación emitida del láser (véase Fig. 34).



*Figura 33. Perillas de ajuste para el láser en los recuadros rojos.*



*Figura 34. Laser de longitud de onda de 850 nm. Donde solo es posible visualizar el láser con la cámara del celular, se puede apreciar como el láser pasa a través de la muestra histológica.*

La salida del láser se colimó a un diámetro de 0.25 mm.

Se llevaron a cabo mediciones sin una muestra histológica y con el láser apagado para determinar la señal de fondo, es decir, el fondo que es captado por el espectrofotómetro

(véase Fig. 35), posteriormente se filtró esta señal de las mediciones con muestra y el láser prendido. A esta le llamaremos “señal ruido”.

Se llevo a cabo la medición con un portaobjetos sin muestra histológica, pero con el láser encendido, como señal  $I_0$  de la ecuación de Lambert Beer

Se coloco en el clip ajustador el portaobjetos con la muestra histológica, se ajustó a ~2cm de la salida del láser, centrando la muestra del tejido en el portaobjetos y en el trayecto del láser, se registró con el software SpectraWiz® el conteo de fotones transmitidos, lo anterior con cada uno de los diferentes grosores de la muestra y las distintas longitudes de onda mencionadas (véase Fig. 36). Se trabajó con este software debido a que la licencia y el programa están incluidos en la compra del espectrofotómetro que fue utilizado; el programa se encuentra instalado en una computadora del Laboratorio de Simulación Monte Carlo que se encuentra en la Facultad de Medicina.

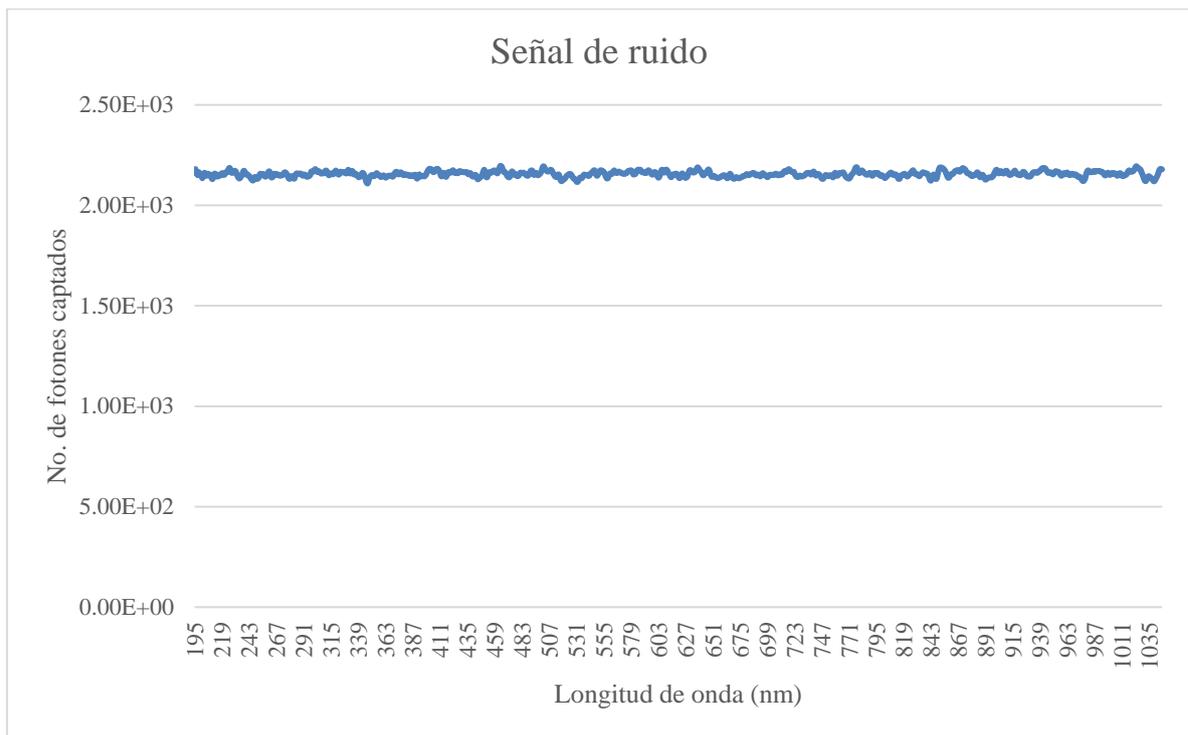


Figura 35. Señal de ruido (fondo) con el láser apagado.

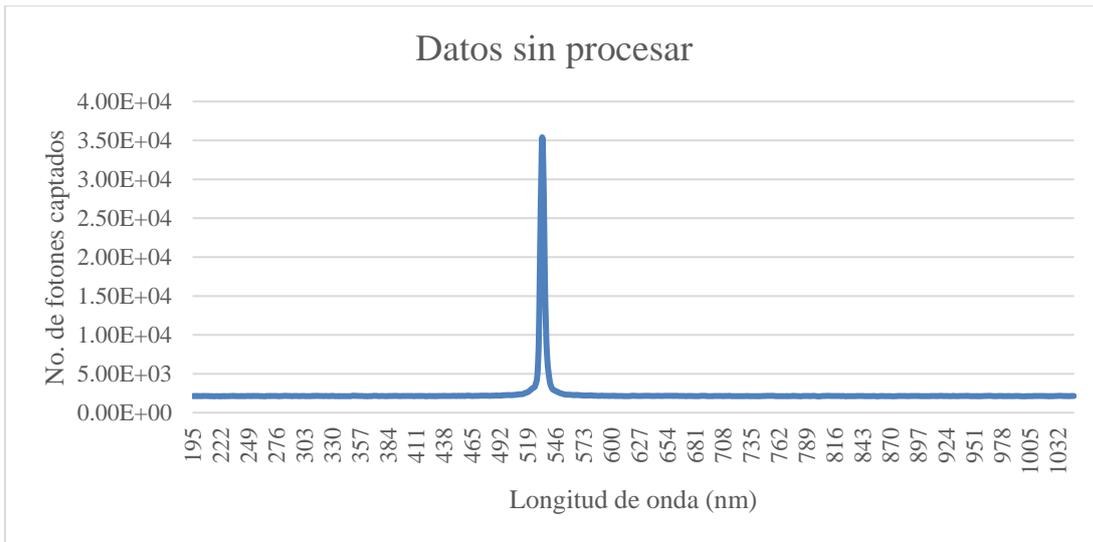


Figura 36. Datos sin procesar, señal resultante del software SpectraWiz®.

#### 4. Procesamiento de la señal.

Después de obtener los resultados del software SpectraWiz® del espectrofotómetro (datos sin procesar) como se observa en la figura 36, en el software Matlab® se leyeron todas las señales resultantes de las pruebas, comenzando con el procesamiento, se filtraron todas las señales obtenidas eliminando la señal de ruido que se observa en la figura 35 (véase Fig. 37). Se trabajó con la versión de Matlab 2021b, la licencia del software fue proporcionada por la Universidad Autónoma del Estado de México y se utilizó el programa en una computadora con Windows 10 de 64 bits con un procesador AMD 12.

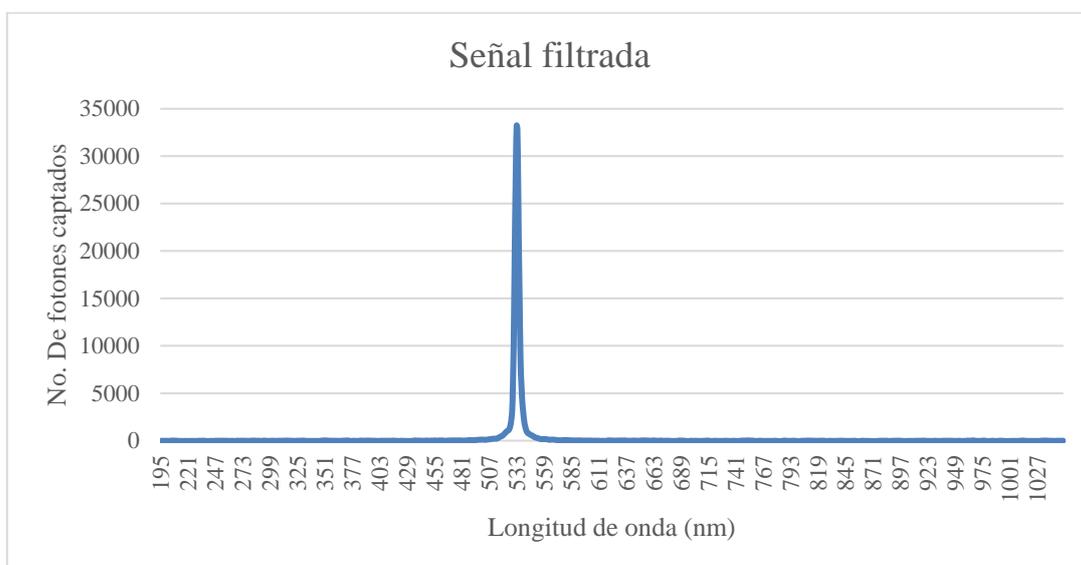


Figura 37. Señal filtrada donde se ha eliminado el ruido de fondo.

Después del paso anterior, trabajando ahora con la señal filtrada donde ya se ha eliminado la señal de ruido, se establecieron los límites a y b (véase Fig. 38). Estos límites se establecieron para centrar los valores de cada señal en la curva donde existe el mayor número de fotones captados, es decir, en la curva donde se encuentra la longitud de onda del diodo láser que se estaría evaluando en ese momento. Los valores fuera del rango de a y b son despreciables debido a que el número de fotones captados es casi igual a 0.

El código para el filtrado de la señal se puede encontrar en el anexo 3.

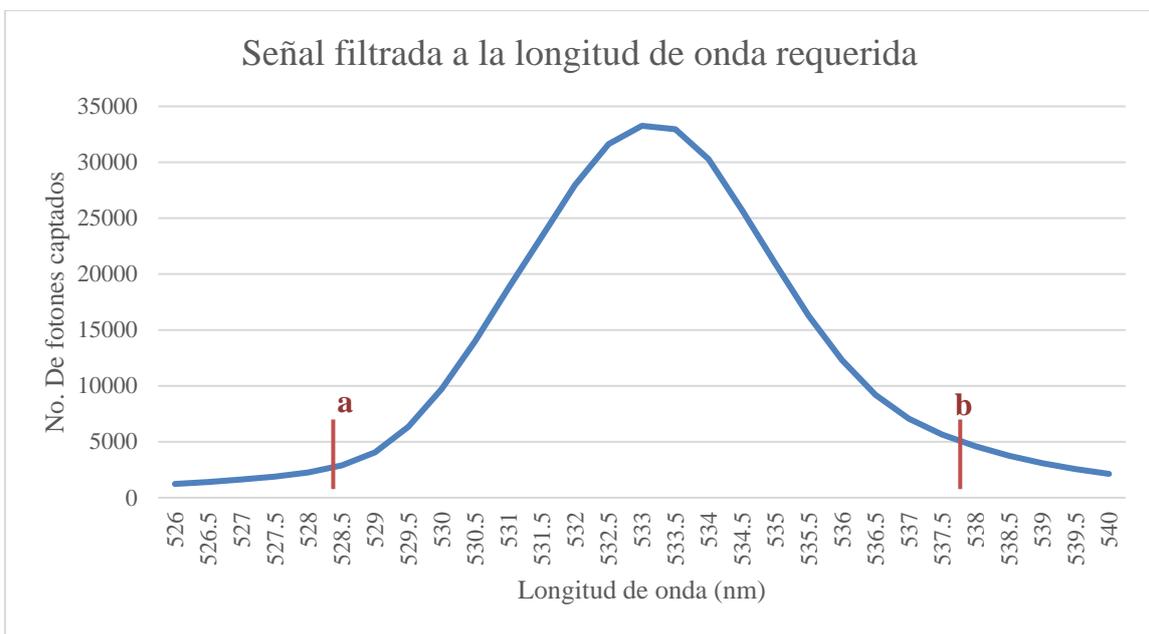


Figura 38. Señal segmentada a la curva de fotones captados según la longitud de onda.

Dichos límites fueron diferentes para cada longitud de onda, pues de acuerdo con cada láser la curva de datos transmitidos que fue captada era diferente. Tomando como referencia la longitud de onda de cada laser y observando en donde comenzaba y terminaba la curva de datos transmitidos se establecieron los límites de la tabla 5. El valor aproximado es de  $X \pm 6 \text{ nm}$ .

**Tabla 5. Límites superiores e inferiores para el manejo de datos donde se encuentra el mayor número de fotones captados para cada longitud de onda.**

Longitud de onda	Límite inferior de datos (a)	Límite superior de datos (b)
405 nm	400 nm	415 nm
450 nm	439.5 nm	454.5 nm
532 nm	528.5 nm	537 nm
635 nm	632 nm	639.5 nm

<b>780 nm</b>	782 nm	792 nm
<b>850 nm</b>	847 nm	862 nm
<b>980 nm</b>	969.5 nm	987 nm

Utilizando Matlab® se crearon nuevos vectores de datos utilizando únicamente la información de las señales que abarcaban estos rangos.

A partir de que se filtró el ruido de las señales, y se establecieron los límites, estas nuevas señales es donde se realizó el resto de los cálculos matemáticos; se calculó el número de fotones usando dos métodos matemáticos, cálculo de los picos máximos de la señal y área bajo la curva.

#### 4.1. Cálculo de los picos máximos de las señales (fotones vs. longitud de onda)

Un método para calcular el valor de fotones con cierta longitud de onda a partir de una señal es obteniendo el punto donde esta función cambia de dirección de creciente a decreciente definiéndolo como punto máximo de la función.

Con ayuda del comando **max** en Matlab® a cada señal se encontró el pico máximo (este comando busca el valor máximo de nuestros datos) (véase Fig. 39) posteriormente se calculó el promedio de los 5 picos máximos que se obtuvieron por cada muestra y por cada laser.

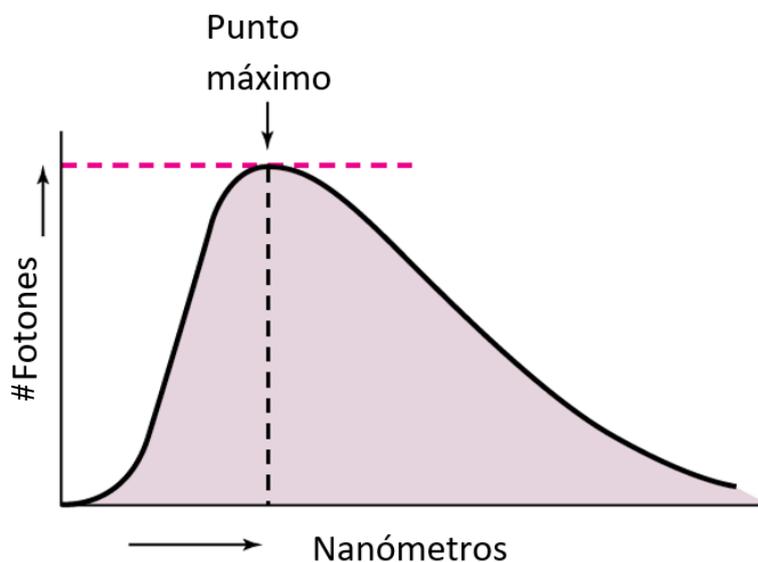


Figura 39. Pico máximo de cada señal.

Con la obtención de los picos máximos de cada señal, se calculó el promedio de estos utilizando el comando de **mean**, haciendo el cálculo de la siguiente manera (véase Fig. 40).

$$\text{Suma} = \text{pico máx. 1} + \text{pico máx. 2} + \text{pico máx. 3} + \text{pico máx. 4} + \text{pico máx. 5} \quad \text{Ecuación 20}$$

$$\text{Pico promedio} = \text{Suma} / \text{Total de datos} \quad \text{Ecuación 21}$$

$$\text{Pico promedio} = \text{Suma} / 5.$$

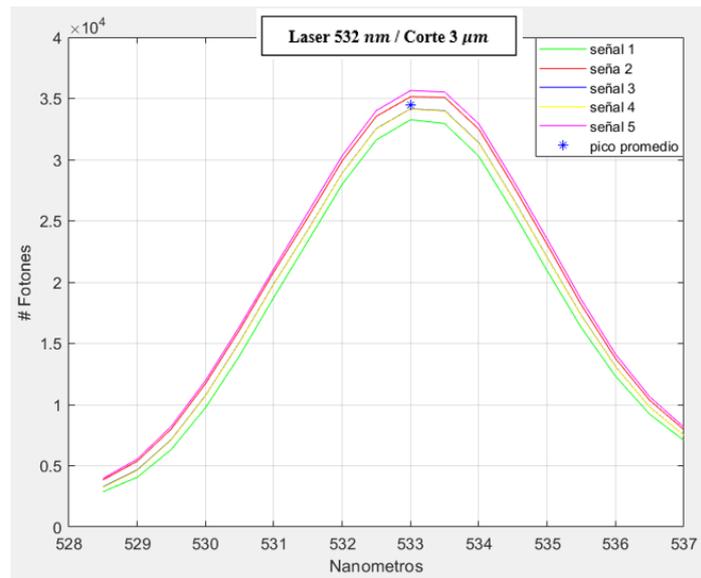


Figura 40. El \* azul marca el pico promedio de datos calculados.

Este valor resultante de promedio se estableció como el valor absoluto del número de fotones por cada muestra histológica.

Se hizo este procedimiento para cada grosor de muestra histológica versus cada longitud de onda del láser.

Así mismo se calculó la desviación estándar de las cinco señales de cada corte versus cada longitud de onda, utilizando como datos de población a nuestros 5 picos máximos con ayuda del comando **std** de Matlab®, este comando utiliza la fórmula de desviación estándar muestral.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 22}$$

Siendo,

S=desviación estándar

$x_i$ = valores obtenidos de los elementos de la muestra

$\tilde{x}$  = promedio de los elementos de las muestras

n = total de número de datos

El código para el método del pico máximo se puede encontrar en el anexo 3.

#### 4.2. Obtención de número de número de fotones por método de la integral.

El otro método que se utilizó para calcular el valor de fotones a partir de cada longitud de onda y cada muestra histológica es calculando el área bajo la curva de cada señal, tomando nuestras señales segmentadas para interpretar únicamente los valores indispensables.

A diferencia del método anterior, para este cálculo el primer paso fue obtener una señal promedio de las 5 señales (ver tabla 6) que se captaron por muestra histológica de acuerdo con cada longitud de onda (véase Fig. 41).

**Tabla 6. 5 señales de cada muestra histológica con cada longitud de onda.**

	<b>Longitud de onda</b>				
<b>Muestra con 1 grosor</b>	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Señal 4	Señal 5

$$\text{suma señales} = \text{señal1} + \text{señal2} + \text{señal3} + \text{señal4} + \text{señal5} \quad \text{Ecuación 23}$$

$$\text{señal promedio} = \frac{\text{suma señales}}{5} \quad \text{Ecuación 24}$$



*Figura 41. Señal promedio.*

Una vez que se obtuvo la señal promedio se procedió a calcular el área bajo la curva, ya que este valor es nuestro número de fotones máximos que fueron captados por el espectrofotómetro.

Como la ecuación que representaba la curva de la señal era desconocida, se prosiguió con el cálculo utilizando el comando **trapez** de Matlab® (ver Fig. 42), para integrar un arreglo de datos donde la ecuación subyacente es desconocida, este comando realiza una integración trapezoidal con los puntos de datos para formar una serie de trapezoides con áreas calculadas fácilmente. Utilizando como límites para el ajuste de la integral los datos de la tabla 5.

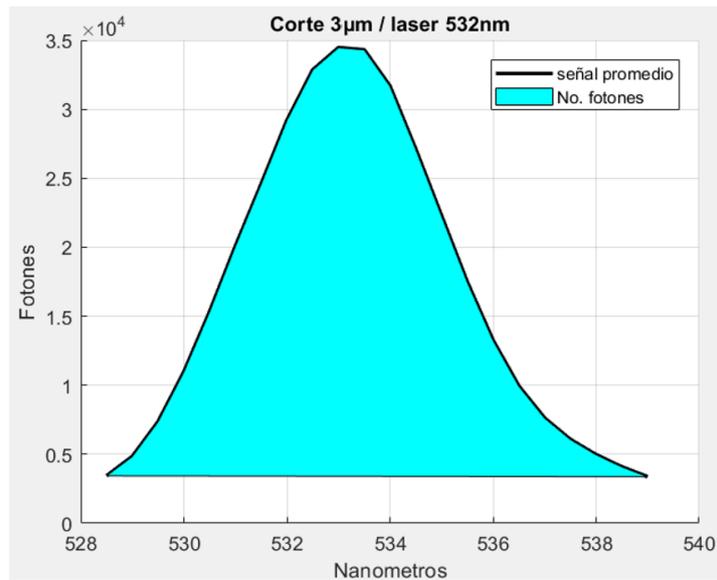


Figura 42. El comando trapz ayuda a contar todos los datos bajo la curva, en este caso el número de fotones.

Para calcular la desviación estándar se utilizó el mismo método que en el caso de picos máximos, con la diferencia que, para nuestra población utilizamos el número de fotones bajo la curva de cada una de las 5 señales.

El código para el método de la integral se puede encontrar en el anexo 4.

#### 4.3 Curva de dispersión

Al obtener el conteo de los fotones captados por el espectrofotómetro al momento de interactuar con las muestras histológicas, se obtuvo la gráfica de decaimiento exponencial para cada longitud de onda, para hacer estos cálculos se utilizó el software Origin®, es un entorno para analizar datos y generar gráficos técnicos, un programa con todo lo necesario para analizar información y graficar los resultados de un estudio o una investigación. Se trabajó con la versión de Origin 8.0 Pro, la licencia del software fue proporcionada por el laboratorio de Dosimetría y Simulación Monte Carlo de la facultad de medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México y se utilizó el programa en una computadora con Windows 10 de 64 bits con un procesador AMD 12.

Para obtener la curva de dispersión de cada longitud de onda el programa debe conocer tres datos; el grosor del corte (eje x), el número de fotones captados (eje y) y los resultados de la desviación estándar calculada para capturar el porcentaje de error de cada muestra histológica.

Una vez que los datos han sido capturados en el programa, se procedió a hacer la interpretación de estos, con ayuda de la sección de análisis, seleccionamos un ajuste de curva no lineal, tomando como método dentro del programa una función de decaimiento exponencial 1. Como resultado de este procedimiento obtuvimos la gráfica de decaimiento exponencial, donde apreciamos la curva de dispersión y la función matemática que la representa (véase Fig. 43).

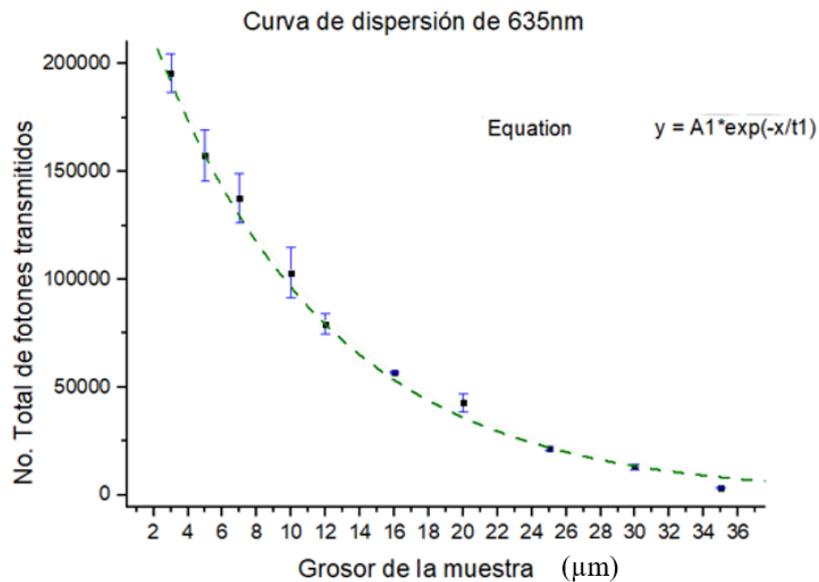


Figura 43. Gráfica de decaimiento exponencial. Donde podemos encontrar la curva de dispersión en color verde, la desviación estándar en color azul y la función matemática.

Para tener un mejor control de los datos, los resultados obtenidos fueron normalizados, esto dividiendo cada número por el valor máximo de fotones obtenidos, es decir el valor de  $I_0$  para cada longitud de onda.

$$\text{No. total de fotones} = \frac{I_0}{\text{No. de fotones para cada corte}} \quad \text{Ecuación 25}$$

#### 4.4 Coeficiente de atenuación lineal

Obtuvimos el coeficiente de atenuación lineal haciendo el despeje de la variable  $\mu$  de la igualación matemática entre la ecuación de la ley de Lambert-Beer y la ecuación resultante de la curva de dispersión.

Teóricamente nuestros datos se comportan de manera exponencial, sin embargo, para obtener resultados precisos se llevó a cabo esa igualación con la curva de dispersión ya que esta representa el comportamiento exacto de los datos.

Ecuación de Lambert Beer (ecuación 4),

$$I_t = I_0 e^{-\mu x}$$

Ecuación que representa los datos,

$$y(x) = A_1 e^{\frac{-x}{t_1}} \quad \text{Ecuación 26}$$

Haciendo la igualación de ecuaciones,

$$I_0 e^{-\mu x} = A_1 e^{\frac{-x}{t_1}} \quad \text{Ecuación 27}$$

Despejando  $\mu$  obtenemos que,

$$\mu = \frac{1}{t_1} \quad \text{Ecuación 28}$$

Donde el valor de  $t_1$  es una incógnita de la ecuación que representa los datos, de la cual obtenemos su valor del programa Origin®

Por último, para calcular el coeficiente de atenuación lineal con su respectivo error aproximado partiendo del error de  $t_1$ , tenemos entonces que,

$$\mu_a = \frac{1}{t_1 + \text{error}}, \quad \mu_b = \frac{1}{t_1 - \text{error}} \quad \text{Ecuación 29 y 30}$$

$$\mu = \frac{\mu_a + \mu_b}{2} \pm \text{Diferencia hacia } \mu_a \quad \text{Ecuación 31}$$

Este procedimiento se realizó siete veces, es decir para cada láser se obtuvo una curva de dispersión por lo tanto un coeficiente de atenuación lineal.

## **Implicaciones éticas**

El procedimiento que se utilizó para la obtención de las muestras histológicas fue llevado a cabo por personal de la Universidad completamente capacitado. Cabe mencionar que ningún animal fue maltratado o sufrió al realizar este proyecto. La manipulación del material biológico también se realizó por personal capacitado.

El cuidado animal y los procedimientos experimentales de los ratones se realizaron de acuerdo con el Comité de Ética Local, así como los lineamientos de la Secretaría de Salud y SAGARPA de México para la Producción y Cuidado de Animales de Laboratorio de acuerdo con la normativa vigente como las Normas Mexicanas Oficiales antes mencionadas [41, 42].

## Resultados

Al igual que en la metodología los resultados se pueden plantear como tres etapas, en la primera etapa el resultado es el dispositivo con geometría de haz estrecho, así como la instalación del sistema; la segunda etapa es la obtención de las muestras histológicas, y finalmente el resultado del procesamiento de los datos o la validación, el número de fotones de las señales captadas, así como la desviación estándar de estos y el cálculo del coeficiente de atenuación lineal, siendo el último el objetivo de este proyecto.

### 1. Dispositivo con geometría de haz estrecho

Basados en el diseño tridimensional y en los materiales seleccionados, se construyó un dispositivo con material base MDF y un acabado negro; cumpliendo con las características necesarias, tiene como dimensiones, sin contar la base de anclaje, una altura de 22.2 cm, un largo de 33.22 cm y un ancho de 13.2 cm (véase Fig. 44 y Fig. 45)

La unión de las caras se hizo con Pegamento Plastiaceró Epóxico R2-42 25 MI Devcon color negro con lo que se evitó la filtración de luz visible.



*Figura 44. Vista lateral del dispositivo con geometría de haz estrecho.*



*Figura 45. Vista superior del dispositivo.*

Por la parte externa del dispositivo, se encuentra la base de anclaje para la mesa óptica, lo que ayuda a darle soporte y estabilización al dispositivo, también se observa el aditamento en la cara anterior (entrada de la fuente de luz) para ajustar los láseres con diferente diámetro. En la cara posterior se encuentra la entrada del detector (véase Fig. 46).



*Figura 46. Caras externas. A) cara anterior, B) cara posterior del dispositivo.*

Por la parte interna, el dispositivo cuenta con el colimador para la luz que se percibe del láser y el riel de apoyo con el clip ajustable (véase Fig. 47).



*Figura 47. Vista superior de la parte interna del dispositivo, donde se aprecia el colimador, el riel y el clip ajustable.*

Al terminar con la construcción del dispositivo, se procedió con la instalación de todo el sistema.

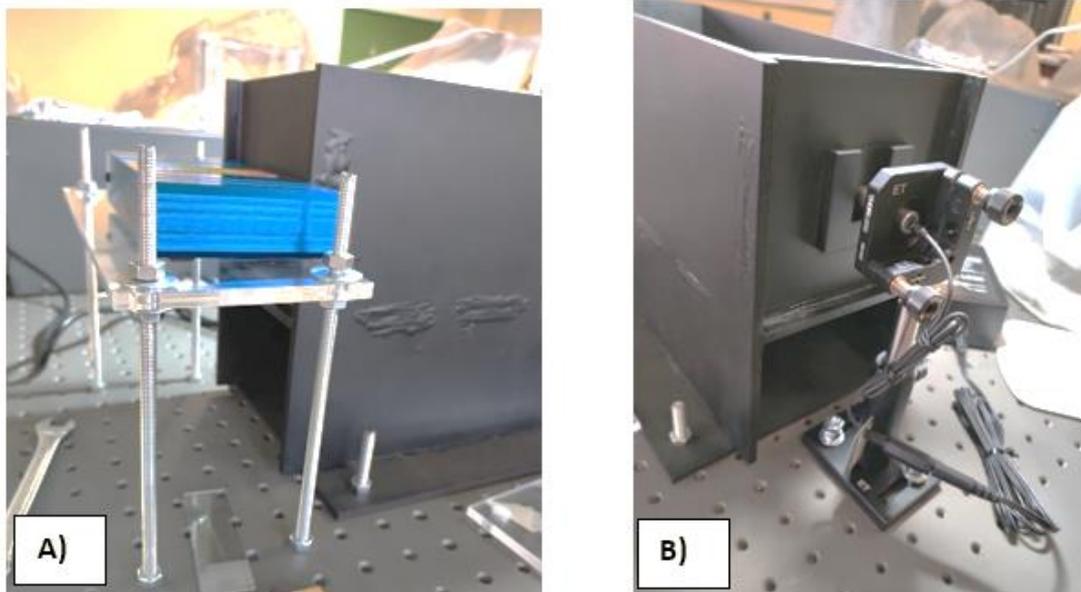
## **2. Instalación del sistema**

El dispositivo y el resto del sistema se instaló en una mesa óptica de trabajo especial utilizada para los láseres ubicada en el Laboratorio de Simulación Monte Carlo bajo la supervisión y apoyo del Dr. en C. Eugenio Torres García, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. Cada componente del sistema se ajustó de acuerdo con las características requeridas (véase Fig. 48).



*Figura 48. Sistema instalado en la mesa óptica.*

La altura final del espectrofotómetro para lograr su alineación con el sistema fue de 13.4cm sobre el nivel de la mesa óptica, el espectrofotómetro se acoplo al dispositivo para impedir el paso de la luz del medio exterior. Mientras que la altura del kit de instalación del láser se estableció en 8cm (véase Fig. 49).



*Figura 49. Acoplo de componentes exteriores. A) El espectrofotómetro se encuentra sobre la base construida para tener la altura correcta respecto al dispositivo, B) acoplamiento del láser en su respectiva base con el dispositivo.*

### 3. Muestras histológicas

Después de seguir con los pasos del corte histológico, hacer los cortes del tejido y colocarlos en el portaobjetos completamente cristalino, obtuvimos nuestras muestras histológicas finales.

Las muestras obtenidas fueron 20 en total (ver tabla 7), todas las muestras son de hígado de un ratón murino macho sano de 12 semanas de edad de la cepa CD1.

**Tabla 7. Muestras con las que se trabajaron (véase Fig. 50).**

Grosor del corte	No. De muestras
3 $\mu m$	2
5 $\mu m$	2
7 $\mu m$	2
10 $\mu m$	2
12 $\mu m$	2
16 $\mu m$	2
20 $\mu m$	2
25 $\mu m$	3
30 $\mu m$	2
35 $\mu m$	1



*Figura 50. Muestras histológicas de hígado de ratón murino para la investigación, desde 3 a 35  $\mu m$ .*

Una vez obtenidas las muestras se procedió a realizar los ensayos (véase Fig. 51).

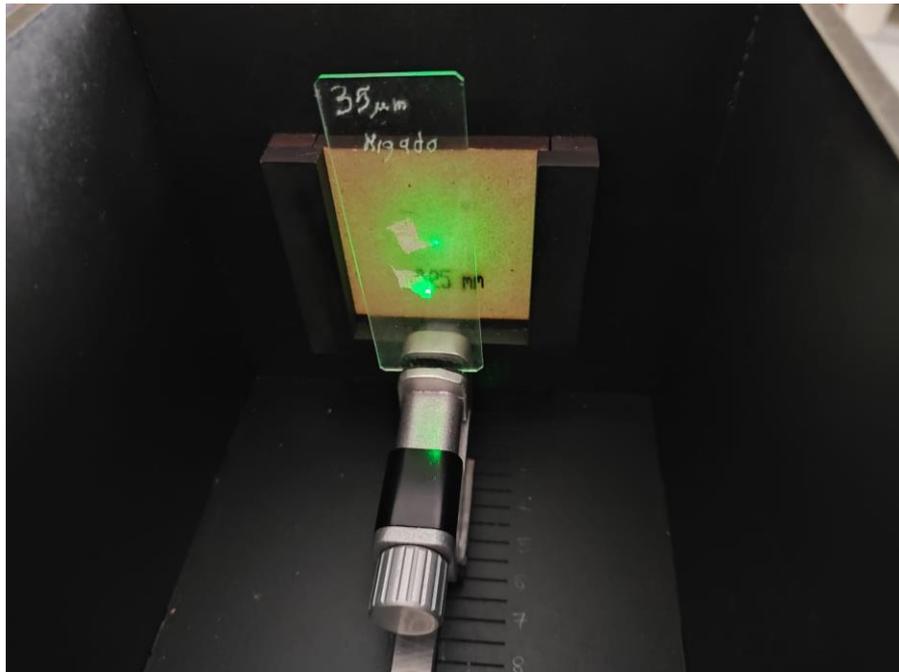


Figura 51. Muestra de 35  $\mu\text{m}$  instalada en el dispositivo, donde el láser de 532 nm interactúa con la muestra.

#### 4. Cálculo de fotones por método de picos.

Siguiendo la metodología, el primer resultado que se obtuvo fue de los 5 picos máximos de cada muestra histológica por cada longitud de onda (ver tabla 8). Posteriormente el cálculo del promedio de estos picos nos daría como resultado el valor promedio del número de fotones por cada muestra histológica (ver tabla 9), cabe mencionar que el pico siempre corresponde a la longitud de onda del diodo láser usado.

**Tabla 8. Picos máximos de cada una de las 5 señales obtenidas de la muestra de 3  $\mu\text{m}$  y con el láser de 532 nm.**

No. De señal con la muestra de 3 $\mu\text{m}$ a 532 nm	Pico máximo (No. De fotones captados)
1	33260.68
2	35136.68
3	34142.68
4	34115.68
5	35645.68

El pico promedio de esta muestra retomando la ecuación 20 y 21 entonces sería:

$$\text{Suma} = 33260.68 + 35136.68 + 34142.68 + 34115.68 + 35645.68.$$

$$\text{Pico promedio} = \text{Suma} / \text{Total de datos}.$$

$$\text{Pico promedio} = \text{Suma} / 5.$$

$$\text{Pico promedio} = 34460.2800.$$

**Tabla 9. Base de datos con el número promedio de fotones en el pico para cada corte versus cada longitud de onda del láser.**

No. Fotones para	laser (405 nm)	laser (450 nm)	laser (532 nm)	laser (635 nm)	laser (780 nm)	laser (850 nm)	laser (980 nm)
3 μm	44937.22	28856.34	34460.28	23412.03	30035.88	21561.54	25155.52
5 μm	35915.11	18928.30	21254.02	19789.02	17491.86	15535.08	22940.12
7 μm	29234.22	17097.30	17568.60	17011.82	11167.22	9564.48	17437.78
10 μm	22823.48	16383.90	13177.30	13540.13	7885.04	9549.48	12850.32
12 μm	10122.58	4752.46	6864.92	10506.56	6227.72	4840.82	8935.70
16 μm	6182.86	4046.58	5477.78	7599.60	3767.82	3614.86	3434.79
20 μm	3508.18	2533.08	4859.54	5758.96	3531.60	2485.70	1059.46
25 μm	392.26	1806.68	1272.98	2871.18	2749.30	1893.80	646.96
30 μm	198.40	861.84	322.12	1709.26	1667.46	1281.30	256.88
35 μm	121.46	659.04	176.75	472.48	653.28	1288.64	140.88

Graficando estos resultados (véase Fig. 52) para una sola longitud de onda logramos observar el comportamiento físico-matemático de la interacción de la luz con las diferentes muestras del tejido biológico.

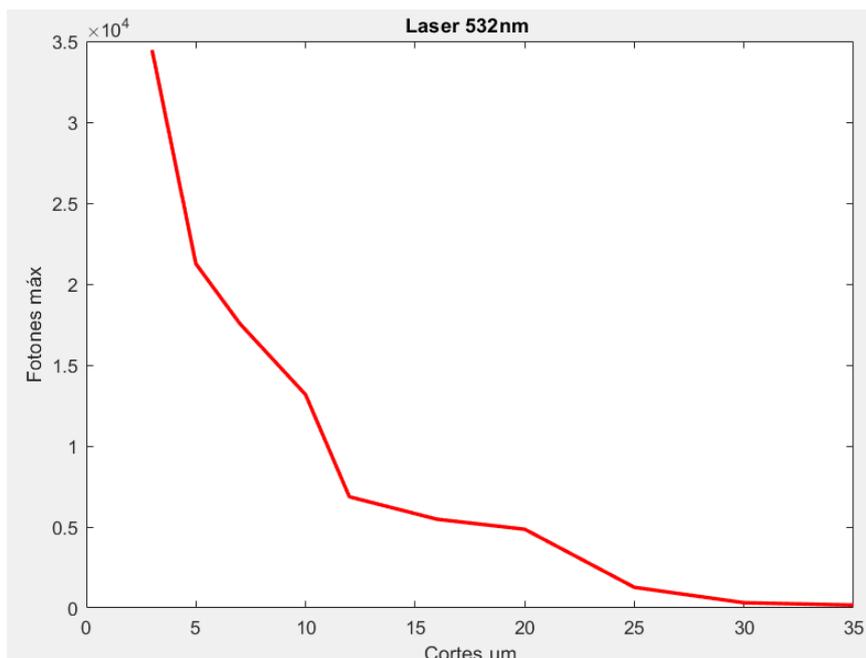


Figura 52. Grafica del comportamiento de la luz de 532 nm con el tejido biológico por el método de pico máximo. Comportamiento decaimiento exponencial.

El número de fotones transmitidos es inversamente proporcional al grosor de la muestra.

Una vez obtenidos los fotones máximos por este método, se obtuvo el cálculo de la desviación estándar de cada valor (ver tabla 10).

Utilizando los valores de la tabla 8 y la ecuación 22 podemos decir que:

$$\sum = (33260.68 - 34460.28)^2 + (35136.68 - 34460.28)^2 + (34142.68 - 34460.28)^2 + (34115.68 - 34460.28)^2 + (35645.68 - 34460.28)^2$$

$$S = \sqrt{\frac{3521349.2}{5 - 1}}$$

$$S = \sqrt{880337.3}$$

$$S = 938.2629$$

**Tabla 10. Base de datos desviación estándar de las 5 señales de cada corte versus cada longitud de onda del láser.**

Desv. Estandar para	laser (405 nm)	laser (450 nm)	laser (532 nm)	laser (635 nm)	laser (780 nm)	laser (850 nm)	laser (980 nm)
3 μm	1636.40	426.79	938.26	807.71	611.13	1135.67	33.15
5 μm	1106.60	1123.21	1585.97	1235.69	1576.89	1099.84	580.92
7 μm	1194.86	1533.86	1670.48	1315.72	1010.62	942.47	1383.24

<b>10 <math>\mu\text{m}</math></b>	1507.52	1375.06	1437.19	1498.96	830.83	1068.45	1194.39
<b>12 <math>\mu\text{m}</math></b>	1031.39	1750.38	814.73	558.53	530.11	498.30	879.48
<b>16 <math>\mu\text{m}</math></b>	483.92	1055.39	154.84	72.23	555.08	437.77	81.36
<b>20 <math>\mu\text{m}</math></b>	298.82	699.90	526.61	545.27	520.34	505.29	92.76
<b>25 <math>\mu\text{m}</math></b>	70.71	1124.22	189.76	127.24	566.38	174.17	57.09
<b>30 <math>\mu\text{m}</math></b>	40.08	78.81	25.15	178.59	203.76	363.47	32.97
<b>35 <math>\mu\text{m}</math></b>	45.73	172.07	55.33	78.99	116.19	74.33	16.62

## 5. Cálculo de fotones por método de la integral.

De acuerdo con la metodología que se siguió para calcular el número de fotones total que fueron captados por el detector, el primer resultado que se obtuvo fue las señales promedio de cada muestra respecto con la longitud de onda (véase Fig. 53).

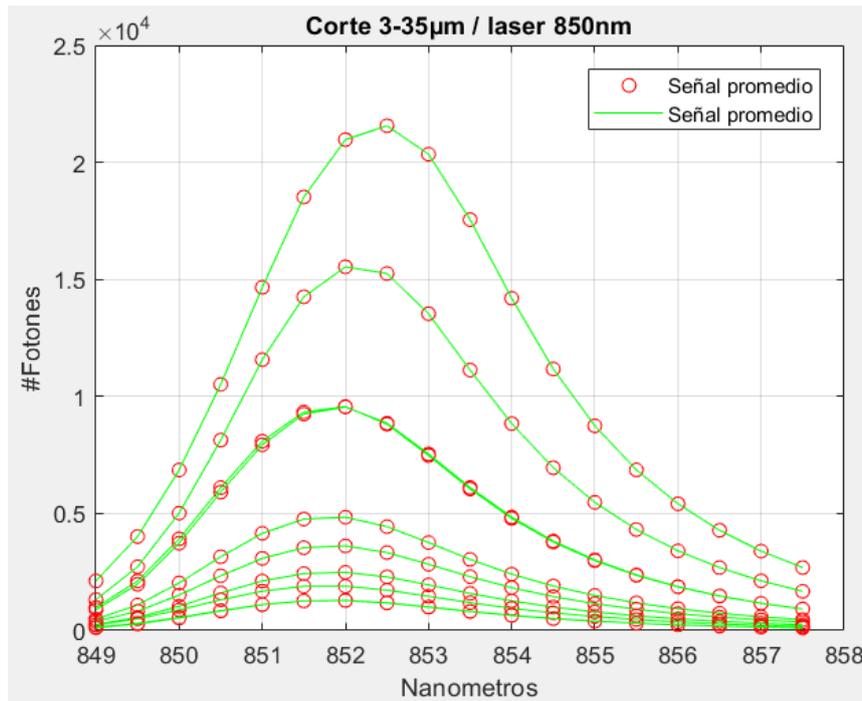


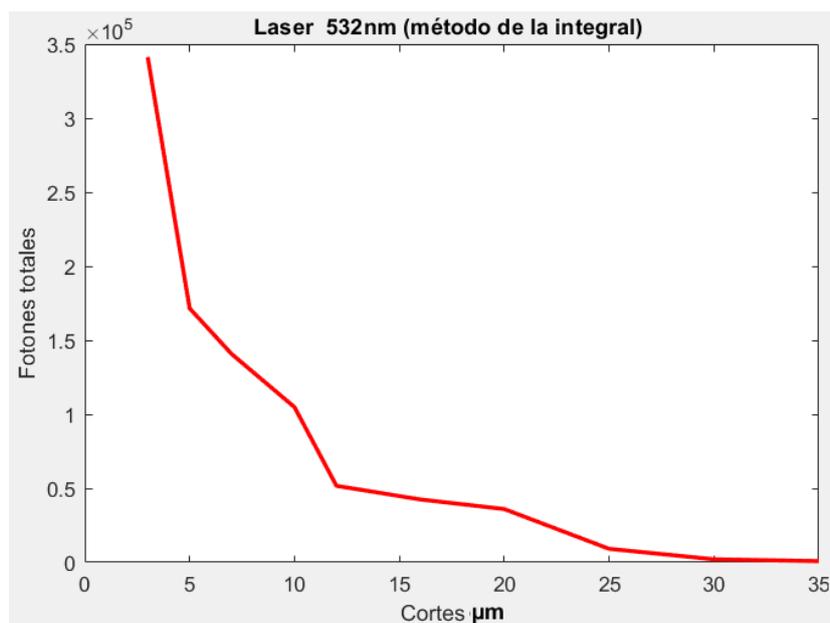
Figura 53. Señales promedio obtenidas con el láser de 850 nm para las 10 muestras histológicas.

Posteriormente se obtuvo el área bajo la curva de cada señal promedio, el resultado es el número de fotones totales captados para cada muestra histológica versus cada longitud de onda, encontramos estos valores en la tabla 11.

**Tabla 11. Base de datos de número de fotones bajo la curva para cada corte versus cada longitud de onda del láser.**

No. Fotones para	laser (405 nm)	laser (450 nm)	laser (532 nm)	laser (635 nm)	laser (780 nm)	laser (850 nm)	laser (980 nm)
3 $\mu\text{m}$	453113.98	250385.27	341269.43	195510.45	307447.05	191461.22	248658.60
5 $\mu\text{m}$	332455.72	145886.63	171544.62	157283.36	152061.60	132435.50	216859.43
7 $\mu\text{m}$	243951.66	131273.60	140743.83	137723.35	92817.20	80820.65	156158.78
10 $\mu\text{m}$	177129.79	124325.34	104819.63	103090.19	65857.84	80338.73	110978.88
12 $\mu\text{m}$	78491.50	35475.14	51679.62	79322.45	50663.03	40985.36	74904.96
16 $\mu\text{m}$	52242.60	30352.62	42489.82	56943.91	33287.07	30826.43	29094.87
20 $\mu\text{m}$	25548.59	20419.42	36005.38	42752.48	28147.14	21210.25	8847.77
25 $\mu\text{m}$	2200.55	13971.75	9144.67	21479.63	22260.33	16389.20	5237.27
30 $\mu\text{m}$	746.11	6543.98	2079.83	13077.02	14824.60	10926.50	1975.50
35 $\mu\text{m}$	21.81	5033.27	852.90	3496.33	4560.00	10904.86	996.47

Los datos de la tabla 10 se graficaron para cada longitud de onda, para que, igual que en el método anterior, se logre visualizar el comportamiento de la atenuación de la luz con los diferentes grosores de las muestras histológicas (véase Fig. 54).



*Figura 54. Grafica del comportamiento de la luz de 532 nm con el tejido biológico por el método de la integral.*

El método de la integral o el área bajo la curva es un método matemático más preciso que el cálculo de los picos máximos ya que modela el comportamiento de la función  $f(x)$  continua entre el intervalo  $a$  y  $b$  de los datos a diferencia de considerar un valor único que modela el comportamiento de todo un grupo de datos como lo limita el cálculo de los picos máximos (véase Fig. 55).

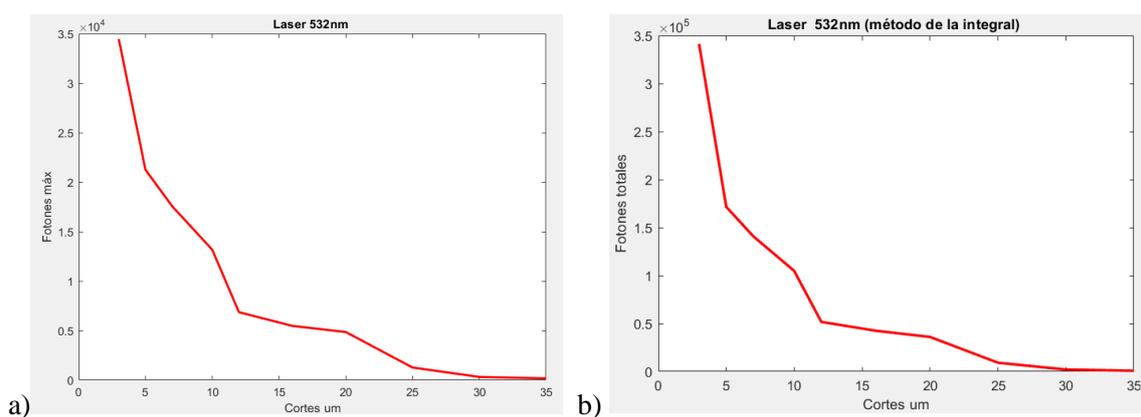


Figura 55. Grafica del comportamiento de la atenuación de la luz de 532 nm con el tejido biológico a) método picos máximos b) método de la integral.

A su vez, igual que en el método anterior se hizo el cálculo de la desviación estándar de los datos (ver tabla 12).

**Tabla 12. Base de datos desviación estándar de las 5 señales de cada corte versus cada longitud de onda del láser con el método de área bajo la curva.**

Desv. Estándar	laser (405 nm)	laser (450 nm)	laser (532 nm)	laser (635 nm)	laser (780 nm)	laser (850 nm)	laser (980 nm)
3 μm	22976.24	6282.09	14577.36	8987.88	10235.10	11304.74	468.63
5 μm	13844.17	10348.22	15838.54	11997.37	15509.91	10534.70	6664.74
7 μm	13579.03	12881.00	14180.85	11252.64	8812.01	7722.38	14315.75
10 μm	13061.95	11697.45	12333.97	11578.54	6930.39	8867.56	11634.36
12 μm	7671.38	12789.79	6085.38	4663.00	4500.89	4154.79	7546.91
16 μm	4141.17	7754.17	1080.80	533.85	4872.68	3844.75	696.74
20 μm	2338.12	5338.25	3811.30	4037.68	4330.13	4183.13	714.65
25 μm	574.77	8257.87	1324.49	950.18	4745.94	1525.81	552.57
30 μm	368.04	658.49	247.11	1319.85	1937.29	3024.90	284.10
35 μm	285.15	1244.65	334.76	559.04	880.56	665.90	173.33

## 6. Coeficiente de atenuación lineal

En esta sección se enlistan los valores de los coeficientes de atenuación lineal, resultado final del procesamiento de los datos, se describe un valor de coeficiente para cada longitud de onda.

Los resultados obtenidos para  $t_1$  del programa Origin® se pueden encontrar en la tabla 13.

**Tabla 13. Valores de  $t_1$  para cada longitud de onda con su respectivo error.**

Longitud de onda	$t_1$ ( $\mu m$ )	$\pm$ error
laser (405 nm)	6.17446	0.34905
laser (450 nm)	6.69719	0.98167
laser (532 nm)	5.18146	0.63671
laser (635 nm)	10.47006	0.31119
laser (780 nm)	10.72127	1.02877
laser (850 nm)	10.24789	1.01583
laser (980 nm)	5.72013	0.39001

Retomando la ecuación 29 y 30 se encontraron los valores para  $\mu_a$  y  $\mu_b$  (ver tabla 14).

**Tabla 14. Resultado para los valores de  $\mu_a$  y  $\mu_b$ .**

Longitud de onda	$\mu_a$ ( $\mu m^{-1}$ )	$\mu_b$ ( $\mu m^{-1}$ )
laser (405 nm)	0.15329171	0.171661737
laser (450 nm)	0.130227664	0.174962208
laser (532 nm)	0.171875349	0.220034105
laser (635 nm)	0.092753623	0.098436145
laser (780 nm)	0.085106093	0.103172556
laser (850 nm)	0.088780616	0.108318187
laser (980 nm)	0.163662371	0.187613037

Tomando los resultados de la tabla 12 y la tabla 13, logramos obtener el valor real para el coeficiente de atenuación lineal de acuerdo con la ecuación 31 (ver tabla 15).

**Tabla 15. Coeficiente de atenuación lineal para cada longitud de onda.**

Longitud de onda	coeficiente de atenuación lineal ( $\mu$ ) en $\mu m^{-1}$	coeficiente de atenuación lineal ( $\mu$ ) en $cm^{-1}$
laser (405 nm)	$0.1625 \pm 0.009$	$1625 \pm 91.9$
laser (450 nm)	$0.1526 \pm 0.022$	$1526 \pm 223.7$
laser (532 nm)	$0.1960 \pm 0.024$	$1960 \pm 240.8$
laser (635 nm)	$0.0956 \pm 0.003$	$956 \pm 28.4$
laser (780 nm)	$0.0941 \pm 0.009$	$941 \pm 90.3$
laser (850 nm)	$0.0985 \pm 0.010$	$985 \pm 97.7$
laser (980 nm)	$0.1756 \pm 0.012$	$1756 \pm 119.8$

En las siguientes figuras se visualiza la representación gráfica del comportamiento de los datos normalizados para cada longitud de onda, así como una breve explicación.

La curva de dispersión que interpreta los fotones transmitidos para la longitud de onda de 405 nm logra interactuar prácticamente con todos los valores, se logra observar que las líneas de error que representan los datos ayudan para obtener un mejor ajuste; mientras más gruesa es la muestra, la transmitancia de fotones se mantiene muy baja respecto a una muestra anterior, los datos obtenidos tienen un comportamiento de decaimiento exponencial (véase Fig. 56).

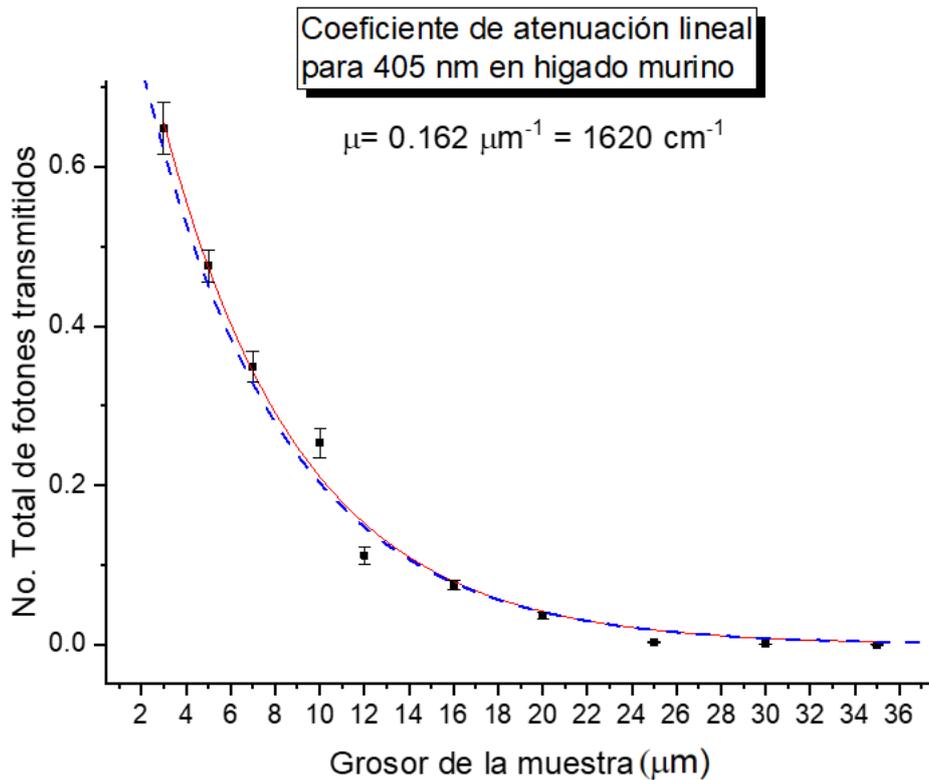
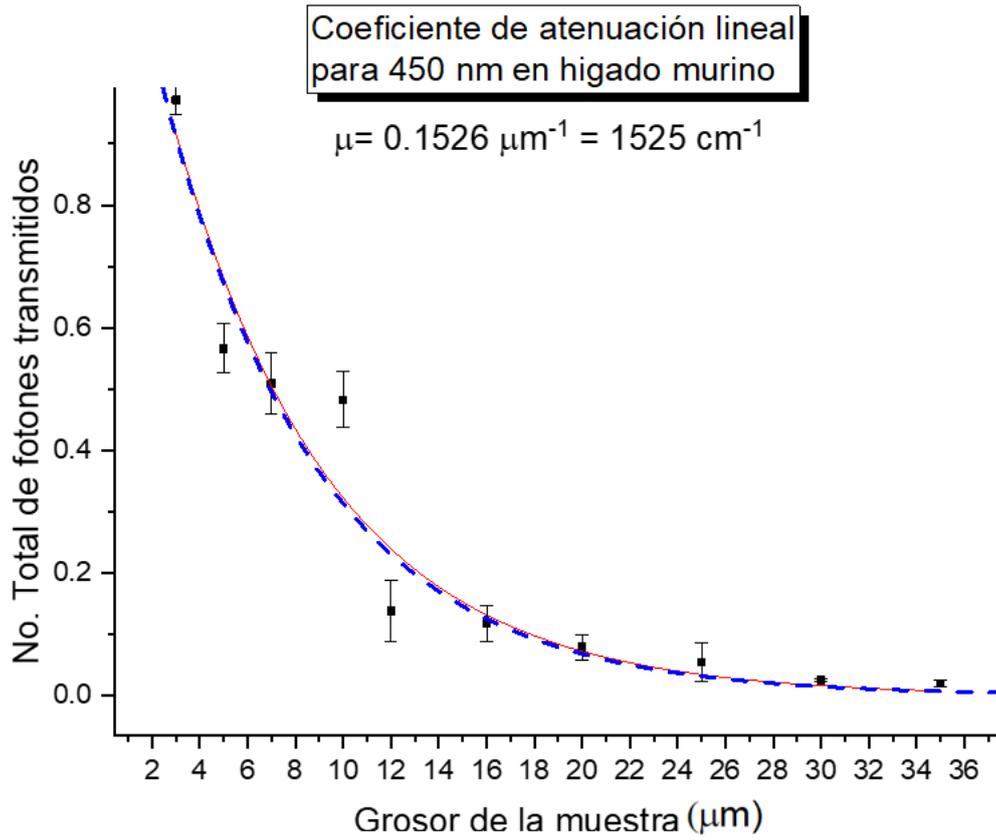


Figura 56. Coeficiente de atenuación lineal para 405 nm en hígado murino.

Para la longitud de onda de 450 nm se observa que el número de fotones transmitidos es muy similar en tres grosores de muestras de 5, 7 y 10 µm y dos de ellos no se ajustan a la curva, haciendo un análisis de datos podemos decir que el tejido biológico en esos ensayos no se evaluó en sus mejores condiciones, probablemente un mal ajuste del láser o de la muestra, siendo la disminución de la transmitancia de fotones muy mínima entre ellos en comparación con los resultados de 405 nm (véase Fig. 57).



*Figura 57. Coeficiente de atenuación lineal para 450 nm en hígado murino.*

Como en el caso anterior se logra observar que la dispersión de los datos de 532 nm se mantiene con poca pérdida en la mayoría de los ensayos, sin embargo, se obtiene un mejor ajuste que en el caso anterior (véase Fig. 58).

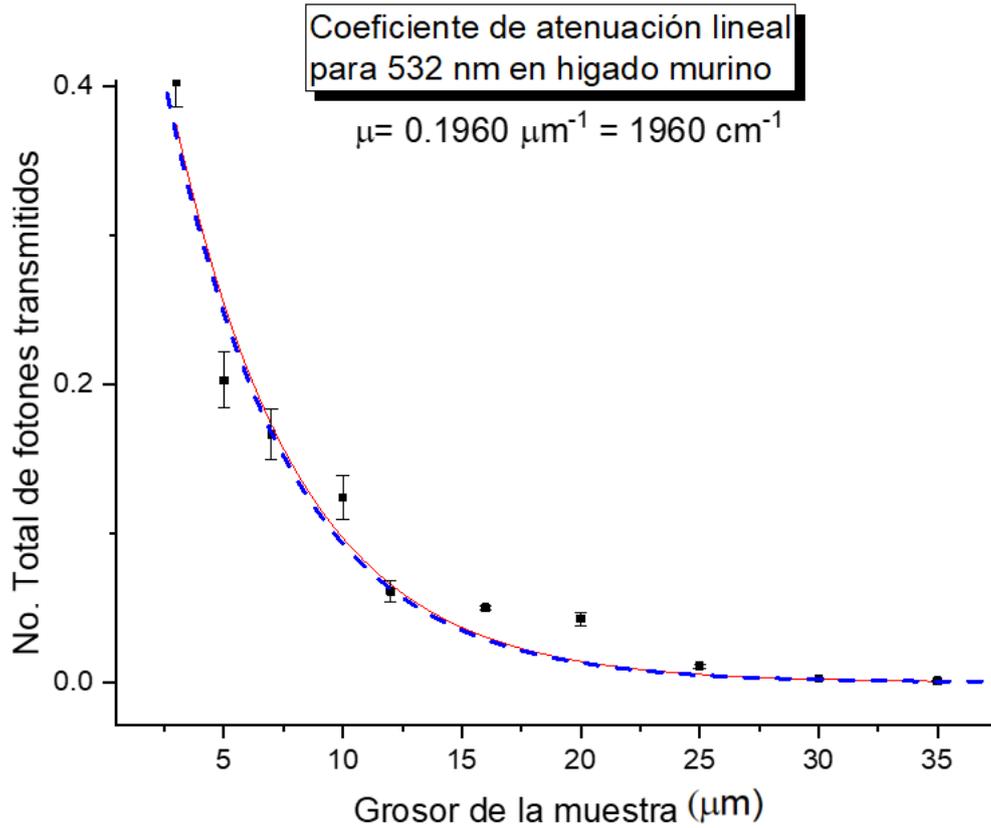


Figura 58. Coeficiente de atenuación lineal para 532 nm en hígado murino.

El ajuste de la curva de dispersión para los resultados de 635 nm mantiene una curva constante. Los valores de la curva se mantienen dentro del rango válido de error. En cuanto al coeficiente de atenuación lineal se ve una disminución del valor en un orden de magnitud, se relaciona con el inicio de la ventana terapéutica (véase Fig. 59).

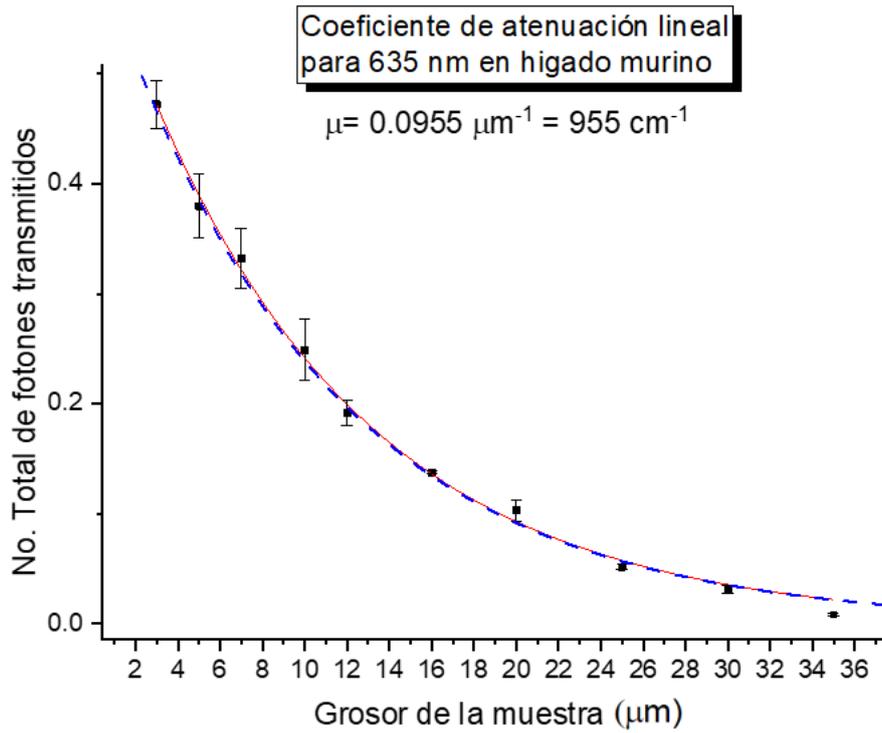


Figura 59. Coeficiente de atenuación lineal para 635 nm en hígado murino.

En la base de datos para la longitud de onda de 780 nm, se encontró datos inválidos debido a una mala práctica, posiblemente se deba a que este láser no es visible al ojo humano, por lo que el ajuste no es preciso. También se debe a la no homogeneidad de las muestras histológicas. Para el ajuste de la curva se tomaron 7 puntos y se despreciaron 3 (véase Fig. 60).

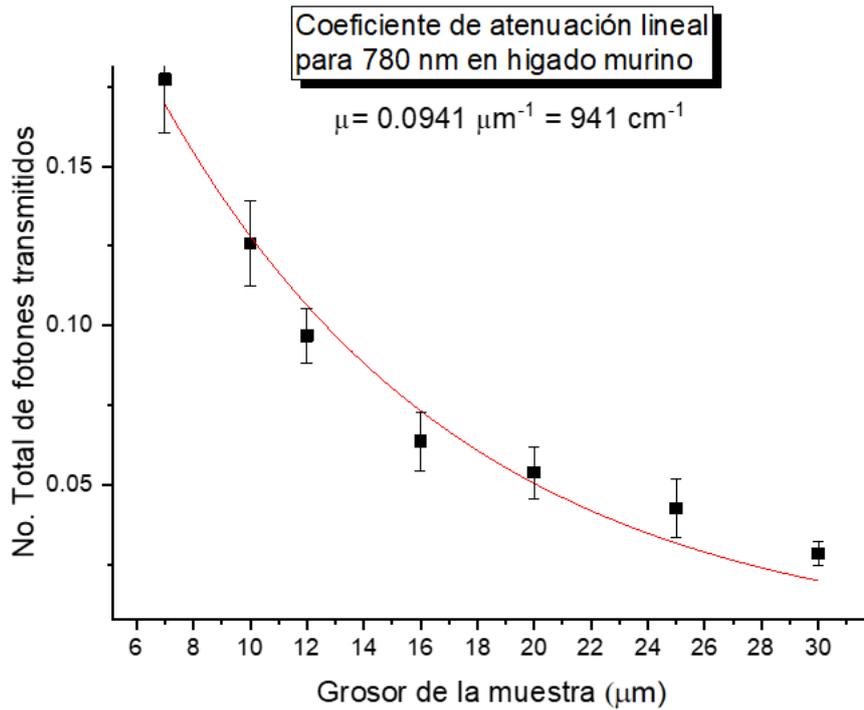


Figura 60. Coeficiente de atenuación lineal para 780 nm en hígado murino.

Igual que en caso anterior, para la longitud de 850 nm los valores para las primeras muestras histológicas han sido despreciados, no implementar estos valores no afecta el resultado debido a que la curva de dispersión hace un ajuste con las muestras histológicas restantes (véase Fig. 61).

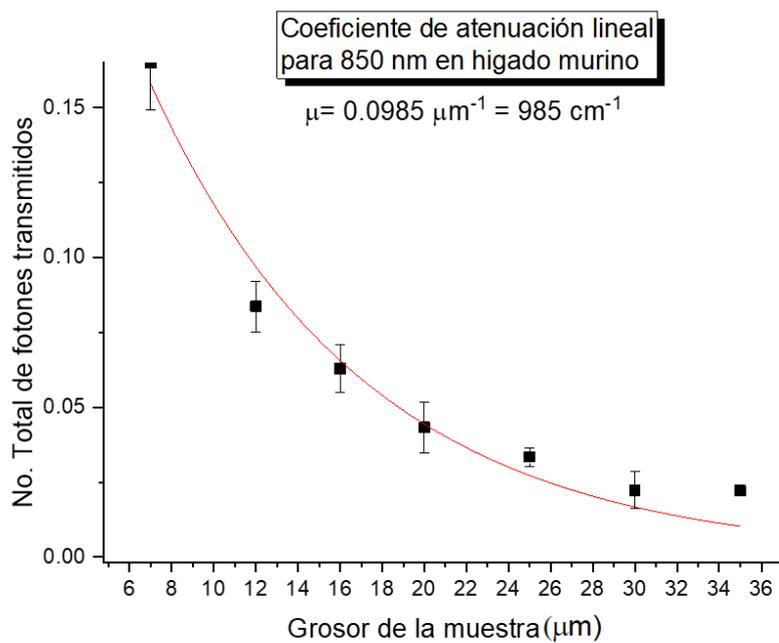


Figura 61. Coeficiente de atenuación lineal para 850 nm en hígado murino.

El comportamiento de los datos obtenidos para la longitud de onda de 980 nm es muy semejante a la longitud de onda de 405 nm, podemos decir que para estas longitudes de onda el comportamiento de la interacción de la luz con el tejido biológico es semejante y en cuanto a los valores del coeficiente se mantienen en cuatro ordenes de magnitud (véase Fig. 62).

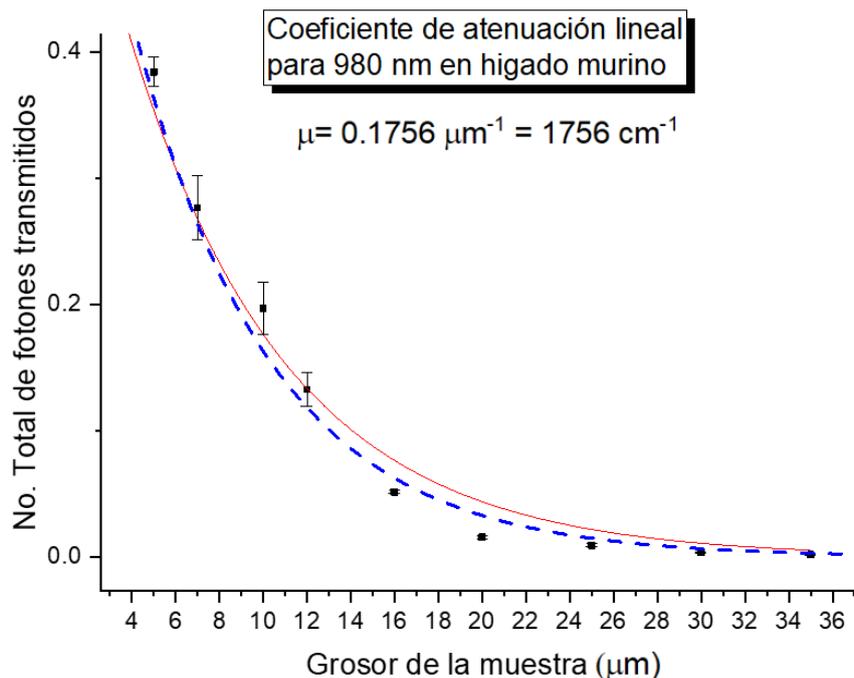


Figura 62. Coeficiente de atenuación lineal para 980 nm en hígado murino.

La figura 63 es un concentrado de las siete curvas del coeficiente de atenuación para cada longitud de onda, se observa que de los 635 a los 850 nm interactúan un menor número de fotones en el tejido biológico, por lo que se puede decir que tienen un comportamiento diferente al resto de las longitudes. Por otro lado, todas las curvas de dispersión tienen el mismo comportamiento, concretando que el método es óptimo para el cálculo del coeficiente de atenuación lineal al menos en las longitudes de onda estudiadas.

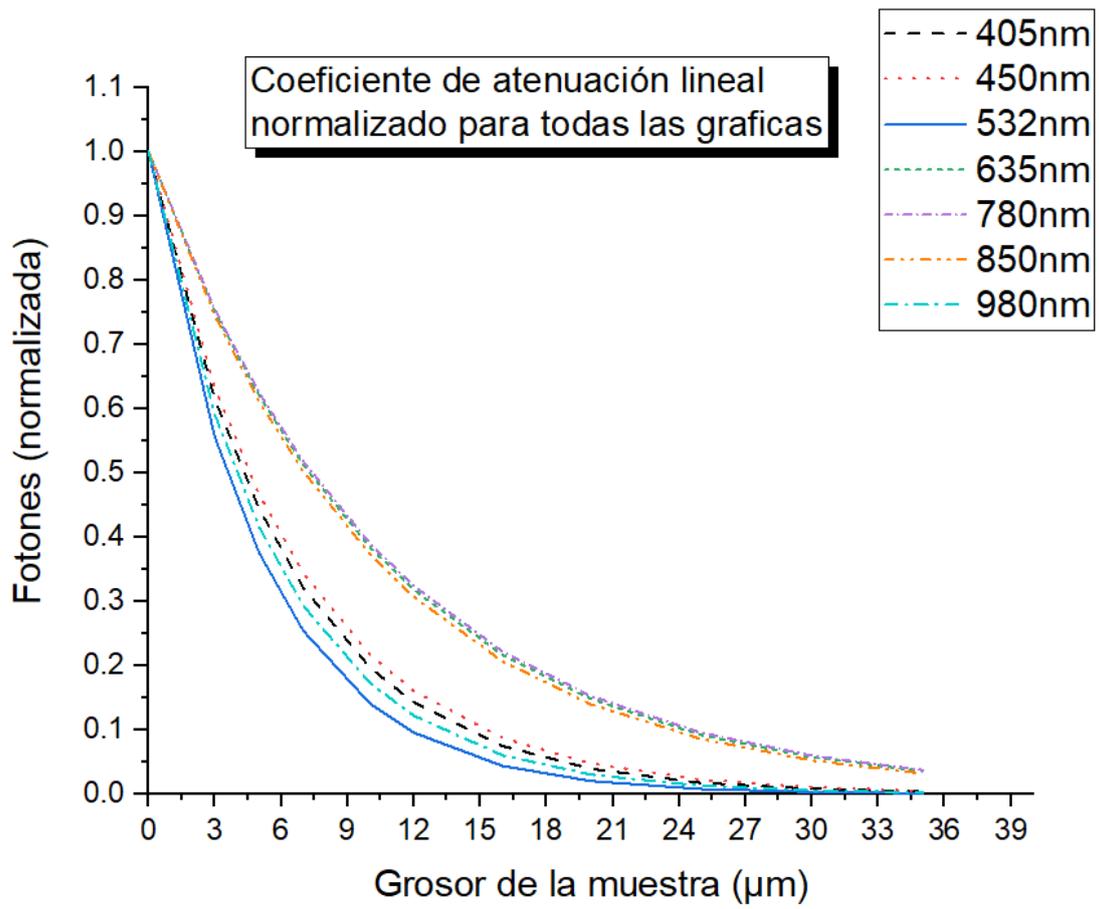


Figura 63. Curvas de dispersión para las 7 longitudes de onda.

## Discusión

Como es bien sabido, la geometría de haz estrecho es eficaz para determinar los coeficientes de atenuación lineal para fotones ionizantes y de acuerdo con los resultados de este trabajo podemos decir que también sirve en el caso de fotones no ionizantes. Las dimensiones del dispositivo, así como los materiales utilizados en la construcción de éste resultaron eficaces para determinar el coeficiente de atenuación lineal, al menos para las condiciones en que se llevó a cabo este proyecto.

Al momento de adquirir los cortes histológicos con el micrótopo nos dimos cuenta de que entre más grueso era el corte, más difícil era obtener una muestra completamente intacta o uniforme, podría deberse al micrótopo utilizado o a las condiciones del laboratorio, ya que una temperatura menor al momento de obtener las muestras hubiera resultado de gran utilidad. Debido a la calidad de las muestras se tuvieron dificultades al momento de alinear las muestras con la fuente de luz.

Comparando los resultados de los dos métodos de cálculo para obtener el coeficiente de atenuación, se observó que el cálculo por el método de la integral o área bajo la curva proporciona y considera una cantidad de fotones en un orden de magnitud mayor que el cálculo por el método del pico máximo, este comportamiento se observó para todas las longitudes de onda estudiadas. Lo anterior no quiere decir que algún método sea incorrecto, pero en términos físico-matemáticos el valor de coeficiente de atenuación es será más exacto usando el método de la integral.

Los valores de coeficiente de atenuación lineal en términos generales son muy semejantes a los reportados en alguna de las fuentes bibliográficas mencionadas, lo que nos da la confianza de decir que funciona adecuadamente nuestro dispositivo, y con base en el diseño del dispositivo de haz estrecho y método de cálculo del coeficiente de atenuación, nos atreveríamos a decir que nuestros resultados son más exactos.

Se logra apreciar una brecha en los resultados obtenidos del coeficiente de atenuación lineal, caracterizando 2 grupos, uno con 4 valores y el segundo con 3 coeficientes, esta diferencia de valores se puede observar gráficamente en la figura 63. Los coeficientes que se mantienen con un valor menor, entre los 900 y 1000  $cm^{-1}$  son los de longitudes de onda de 635, 780 y 850 nm.

Analizando los resultados y de acuerdo con otros estudios reportados en la teoría, la ventana óptica comprende desde los 650nm hasta los 1300 nm o incluso sin un límite superior.

De acuerdo con lo ya dicho, se podría interpretar que el grupo 2 de coeficientes (635 nm, 780 nm y 850 nm) se encuentran dentro de la ventana óptica, esta es la razón por la que los coeficientes de atenuación lineal correspondientes a estas longitudes de onda son menores al resto. Sin embargo, se requieren estudios más minuciosos y rigurosos para asegurar que nuestros resultados son los correctos, lo anterior deja la ventana abierta para trabajo a futuro en esta línea de investigación.

Desde otro punto de vista las longitudes de onda que comprenden desde los 405 nm hasta los 532 nm e incluyendo la longitud de 980 nm, es decir el grupo 1, tienen un coeficiente de atenuación muy semejante, esto porque, al contrario que el caso anterior, el coeficiente de atenuación o sección eficaz de interacción es mayor para estas longitudes de onda.

Los coeficientes resultantes son muy cercanos a los coeficientes reportados para la sangre, esto quiere decir que el tejido estudiado en este trabajo no tuvo un proceso de exanguinación completamente exitoso.

## Conclusiones

Gracias al arreglo de geometría de haz estrecho es posible discriminar la radiación dispersa que se produce por la fuente de luz, permitiendo determinar el coeficiente de atenuación lineal únicamente con la cuantificación de los fotones balísticos.

De acuerdo con los dos métodos utilizados para calcular el número de fotones transmitidos, se llegó a la conclusión de que el método de la integral o cálculo del área bajo la curva es más preciso que el método por conteo de fotones de picos máximos porque en el método de la integral contabiliza la cantidad de fotones total que son transmitidos y no un valor único que modela el comportamiento de todo el grupo de datos.

Se determinó el comportamiento del coeficiente lineal de atenuación para tejido de hígado murino para las longitudes de onda que comprenden desde los 405 hasta los 980 nm.

Nuestros resultados incluso muestran la existencia de la ventana terapéutica para el tejido biológico, aunque el intervalo de esta difiere de lo reportado anteriormente, lo que muestra la necesidad de realizar más estudios con más rigor científico para poder afirmar que nuestros resultados son los correctos.

Homogenizar los coeficientes de atenuación lineal bajo las mismas condiciones de estudio permitirá caracterizar ópticamente los tejidos, lo que en consecuencia llevaría a realizar dosimetría óptica más exacta, así como mejorar la calidad de las imágenes ópticas usadas en la preclínica para el diagnóstico de diferentes patologías.

Siguiendo la teoría de ángulo sólido y divergencia del haz, y tomando en cuenta todas las medidas de los elementos que comprendieron el sistema de este proyecto fue posible determinar dimensiones específicas para el diseño y construcción del arreglo con geometría de haz estrecho ideal para el desarrollo del proyecto.

De acuerdo con las especificaciones de diseño el software SolidWorks® nos ayudó a modificar y corregir el diseño del dispositivo hasta lograr el mejor arreglo; con ayuda de simulaciones de comportamiento y de medidas con los otros elementos, el ensamblaje de todo el sistema (detector, fuente de luz y dispositivo) resultó en medidas exactas, lo que permitió un correcto cálculo del coeficiente de atenuación lineal, gracias al aislamiento del dispositivo y a la absorbancia que posee el recubrimiento interior. La maleabilidad de los materiales seleccionados y sus propiedades físicas ante la luz nos dieron buenos

resultados al momento de llevar las mediciones, esto se comprobó matemáticamente con la señal de ruido que es estadísticamente aceptable, entonces se logra concluir que estos materiales son útiles para el estudio de la luz. Además de que la desviación estándar de los datos obtenidos tiene valores bajos, en algunas ocasiones no se alcanzaba a visualizar en las gráficas, esto quiere decir que la varianza entre los datos de la misma longitud de onda y la misma muestra es muy pequeña, por lo que el detector siempre captaba la misma o casi la misma cantidad de fotones.

Tomando en cuenta el arreglo de geometría de haz estrecho que se construyó, es importante mencionar que el tener un buen aislamiento tanto de luz como de vibraciones externas en el arreglo geométrico es crucial para la discriminación de radiación dispersa y así captar también el menor ruido posible en las señales.

Para la obtención de las muestras histológicas según lo aprendido en este proyecto, no solo es importante hacer el procedimiento de corte histológico correctamente, también se debe considerar el equipo que se va a utilizar y el ambiente en el que se trabaja, para este estudio podemos concluir que para hacer cortes de tejido más gruesos es importante contar con un microtomo especializado para eso y que para mejores resultados es ideal tener una baja temperatura en el ambiente, un cuarto con buen aislamiento térmico.

## Trabajo a futuro

Durante la elaboración de este proyecto se identificaron las diferentes oportunidades de investigación que se pueden realizar con el mismo dispositivo, algunas de ellas para determinar mejor los resultados obtenidos y otras para encontrar diferentes coeficientes en otros tejidos, esto puede ser tanto en tejidos sanos como en tejidos patológicos. Estos estudios no fueron abordados en esta tesis debido al alcance que pueden tener, sin embargo, se describe a continuación algunos trabajos a futuro que se pueden tener con las bases de este proyecto.

Como ya se ha discutido, los resultados obtenidos para el coeficiente de atenuación lineal indican una ventana terapéutica con nuevos límites a los reportados en la teoría hasta el día de hoy, sin embargo esta investigación no profundiza en estos resultados pues no es el principal objetivo del trabajo, este punto se podría abordar en otra investigación; para determinar si en verdad la ventana terapéutica no es tan extensa como ya se ha reportado en otros trabajos de investigación, esto nos diría que por ejemplo si se utiliza una longitud de onda de 532 nm tendríamos el mismo resultado que si utilizáramos una longitud de onda de 980 nm, pero para lograr tener una afirmación de estos resultados es necesario hacer más estudios experimentales y teóricos más rigurosos, que corresponderían a un proyecto de tesis de maestría y doctorado.

Otro trabajo de investigación que puede dar continuación a este proyecto sería la caracterización de más tejidos biológicos, por la limitación de este trabajo las pruebas solo se hicieron para un tejido. Sin embargo, el dispositivo funciona para evaluar cualquier tejido, entre más tejidos sean caracterizados, mayor será el alcance de la fototerapia. Esto para apreciar las diferencias entre tejidos, y caracterizar el comportamiento de la luz. Además de los diferentes tejidos también se pueden evaluar diferentes longitudes de onda, las longitudes de onda que fueron evaluadas se limitaron a un rango reducido, en cambio, se podrían estudiar más longitudes de onda y entender mejor el comportamiento de la luz y la ventana terapéutica.

Un mayor alcance que este trabajo de investigación podría tener es el caracterizar tejidos patológicos, es decir, si una enfermedad logra cambiar la morfología de algún tejido esto podría observarse en el cálculo del coeficiente lineal de dicho tejido, pues como la estructura del tejido cambia, afecta directamente al paso de la luz transmitida. De esta

forma se lograrían caracterizar distintas enfermedades en los tejidos y conocerlas mediante la obtención del coeficiente lineal del mismo.

Finalmente se podría intentar crear un dispositivo a una escala mayor para el estudio del sistema in vivo y ver si se tiene el mismo comportamiento.

## Referencias

- [1] Fontal, B. *El Espectro Electromagnético y sus Aplicaciones* (Escuela Venezolana para la enseñanza de Química, ed.). Mérida, Venezuela. 2005; p. 6-16.
- [2] Dolmans, D. Fukumura, R. *Photodynamic therapy for cancer*, Rev. Nac. Cancer, 2003; 3(5), 380-387.
- [3] Andreo, P. Burns, D.T. *Determinación de la dosis absorbida en radioterapia con haces externos*. OIEA, VIENA. 2005
- [4] Quispe, J. *Procedimientos de fototerapia con láser terapéutico en terapia física*. Universidad Inca Garcilaso De La Vega. [Tesis], 2017.
- [5] Macara, Daniel. *Óptica Básica*. 3ª ed. México Editorial: Fondo de Cultura Económica. 2015; p. 29-30.
- [6] Savall, F. Blanco, J. *The introduction of the photon concept in upper secondary school*. Revista Brasileira de Ensino de Física, 2013; v. 35, n. 2, 2404.
- [7] Araujo, S. *Aplicación del principio de Fermat a la tomografía sísmica. Parte I: fundamentos físicos*. La Granja, 2010; 12(2), 13.
- [8] Carlos, A., & Daniel, R. *Luz e imagen médica: Tomografía Óptica*. Vida Científica, Colaboraciones En Física No. 3, 2010; 3–75,
- [9] Pascual, I. Hernández, C. *Prácticas de óptica geométrica y radiometría*. Publicaciones de la Universidad de Alicante, Alicante, 1988.
- [10] Beléndez, A. *Fundamentos de óptica para ingeniería informática*. Publicaciones de la Universidad de Alicante, Alicante. 1996.
- [11] Skoog, D. *Principios de análisis instrumental*. Cengage. Sexta edición. 2008.
- [12] Aguilera, M. *Estudio de la dependencia del coeficiente de absorción de luz con la longitud de onda*. Universidad de Santiago de Chile, Chile. [Tesis], 2010.
- [13] Abril, N. Bárcena, A. Fernández, E. *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba. 2015.
- [14] Ibañez. M., Rojas. J. *Medición de la transmitancia espectral de filtros de gelatina*. Revista mexicana de física, 2006; 52 (1) 47–50.
- [15] Sandell, J., Zhu, T. *A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT*. National Institute of Health. Biophotonics, 2011; 4(11-12): 773-787.
- [16] Sánchez, E. Millán, E. *Fitogeografía a partir de las curvas espectrales del coeficiente de absorción de luz*. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. 2001.
- [17] Ravikant, S. V. *Determination of optical scattering properties of tissues using reflectance-mode confocal microscopy*. [Tesis]. 2012.
- [18] Chang D., Lasley F., Das I. *Characteristics of Photon Beams*. In: *Basic Radiotherapy Physics and Biology*. Springer, Cham. 2014.
- [19] Vogel, A. Venugopalan, V. *Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues*. Chemical Reviews, 2003; 103 (2), 577-644.

- [20] Prah. S. *Optical Property Measurements using the Inverse Adding- Doubling Program*. 1995.
- [21] Jacques, S. L. Erratum. *Optical properties of biological tissues: A review*. Physics in Medicine and Biology. 2013; 58(14), 5007–5008.
- [22] Ashley J. Welch. C. *Optical-Thermal Response of Laser Irradiated Tissue*. Springer, Segunda edición. 2011.
- [23] Monterroso. E. *Dispersión de fotones de bajas energías en elementos ligeros*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. [Tesis]. 2017.
- [24] Moy, A. J., Capulong, B. V., B. *Optical properties of mouse brain tissue after optical clearing with FocusClear™*. Journal of Biomedical Optics, 2015; 20(9).
- [25] Erickson, k. *¿Qué es un láser?* Artículo publicado en Nasa Science, Space Place, 2021.
- [26] Gómez, E. *Fuentes de luz y emisión láser*. Campos electromagnéticos – Óptica, Universidad de Sevilla. 2010.
- [27] KEYENCE MÉXICO S.A. DE C.V. *Guía técnica láser una introducción*. Av. Paseo de la Reforma 243, P11, Col. Cuauhtémoc, C.P. 06500, Del. Cuauhtémoc, Ciudad de México, México. 2021.
- [28] Lemus, J. *Los diodos láser. Necesidad de su utilización en la enseñanza de la física en ingeniería y resultados preliminares de su aplicación*. 14 convención científica de Ingeniería y Arquitectura. La Habana Cuba. 2008.
- [29] Vivacity. Determinación del tamaño de partículas por difracción. [Figura] Recuperado de: <http://www.vivacity.com.br/produtosDetalhes.asp?id=1414&link=Determina%E7%E3o%20do%20Tamanho%20da%20Part%EDcula%20por%20Difra%E7%E3o&subCat=14%2012&idCat=42>. Descargada el 2021.
- [30] Serra, R. *Experimentos didácticos con puntero de diodo láser que apoyan el estudio de la óptica en ingeniería*. Ingenio Libre. 2014; 12 1-9.
- [31] Soldovier, T. Viloria, T. *Ángulo sólido y algunas de sus aplicaciones*. La Universidad del Zulia. 2016.
- [32] Redondo, F. Redondo M. *Ángulo plano y ángulo sólido*. Universidad de Salamanca. 2017.
- [33] Alvarez C., E. *Elementos de geometría, con numerosos ejercicios y geometría del compás*. Editorial Universidad de Medellín, 2003. pp. 368 - 370.
- [34] Willar H. Merrit L. *Métodos de Análisis Instrumental*. Iberoamérica México. 1991.
- [35] González, S. Vargas G. *Diseño construcción de espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda para análisis de transporte de electrones entre membranas*. Universidad Nacional de Colombia. Montevideo. 2005.
- [36] StellarNetInc. The StellarNet BLUE-Wave miniature spectrometers [internet] [consultado 21 junio de 2021] Disponible en: <https://www.stellarnet.us/spectrometers/blue-wave-miniature-spectrometers/>
- [37] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. *Animales de experimentación. Roedores de laboratorio con que cuenta el bioterio*. [boletín] 2021.
- [38] FONDECYT-CONICYT. *Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal*.

Chile. 2009.

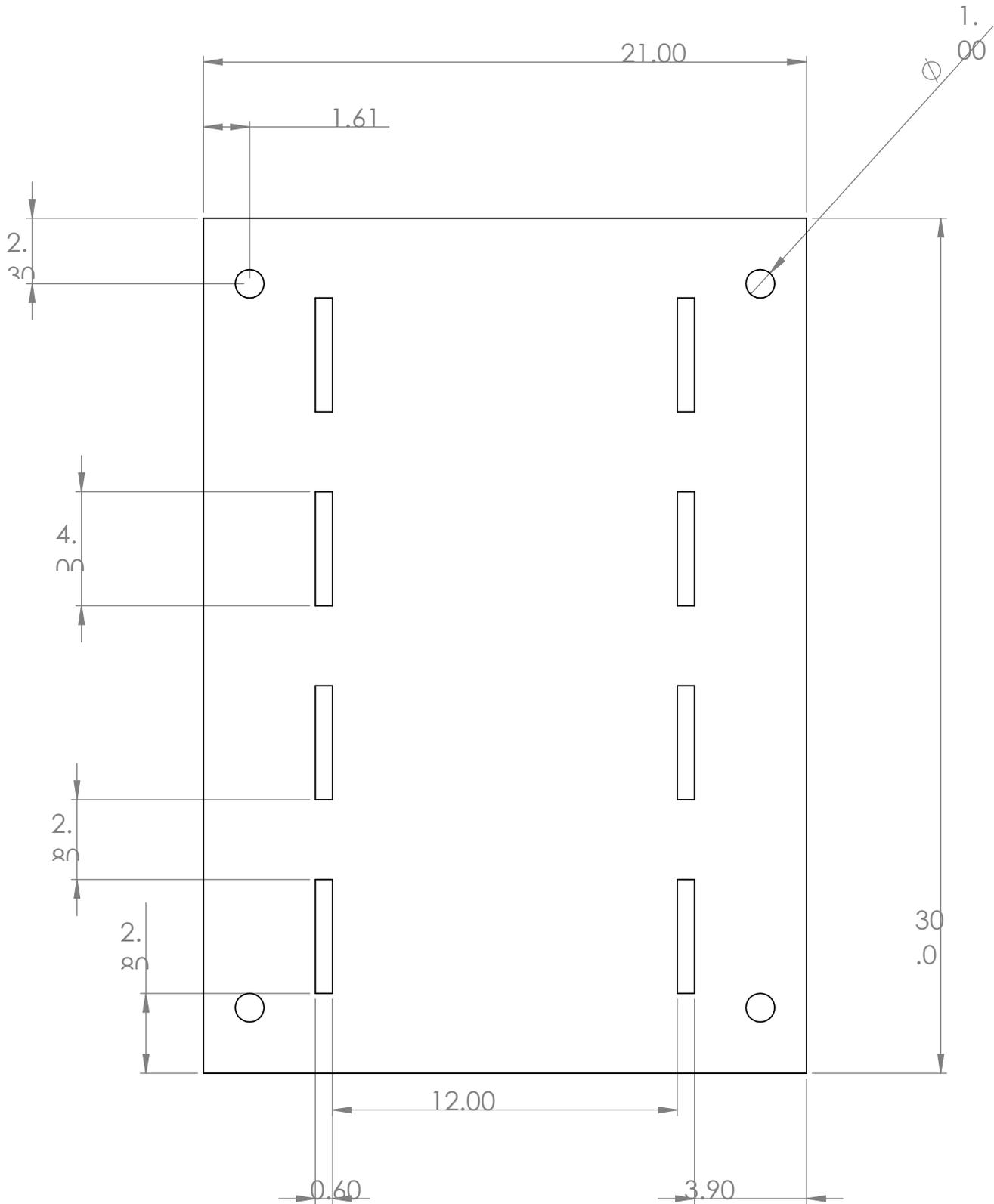
- [39] CÓDIGO DE NÜREMBERG. Tribunal Internacional de Nüremberg. 1946.
- [40] Rodríguez, E. *Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas*. Acta Bioethica, 13(1) Santiago. 2007.
- [41] *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. NOM-062-ZOO-1999. DIARIO OFICIAL miércoles 22 de agosto de 2001.
- [42] *Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres*. NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, DIARIO OFICIAL miércoles 26 de agosto de 2015.
- [43] Fortoul. T. *Histología y Biología Celular*. 3ra. Ed. Mc Graw Hill, Ciudad de México. 2017.
- [44] G. Coté, L. Wang, S. Rastegar. *Biomedical optics and lasers*, in Introduction to bio-medical engineering, J. Enderle, S. Blanchard, J. Bronzino, Eds., Elsevier Academic Press, Burlington (MA), 2005; 977-1085.
- [45] Lister, T., Wright, P., Chappell, P. *Optical properties of human skin*. Journal of Biomedical Optics. 2002; 17(9).
- [46] R. Esenaliev, K. Larin, I. Larina, *Noninvasive monitoring of glucose concentration with optical coherence tomography*, Opt. Lett. 2001; 26(13), 992-994.
- [47] E. Granot, S. Sternklar, *Spectral ballistic imaging: a novel technique for viewing through turbid or obstructing media*, J. Opt. Soc. Am. A 2003; 20(8), 1595-1599.
- [48] V. Tuchin, *Optical clearing of tissues and blood using the immersion method*, J. Phys. D: Appl. Phys. 2005; 38(15), 2497-2518.
- [49] P. Vacas-Jacques, G. Paez, M. Strojnik, *Pass-through photon-based biomedical tran- sillumination*, J. Biomed. Opt. 2008; 13(4), 041307.
- [50] Y. Yamada and S. Okawa, *Diffuse optical tomography: present status and its future*, Opt. Rev. 2014; 21(3), 185-205.
- [51] H. Dehghani, B. Pogue, J. Shudong, B. Brooksby, K. Paulsen, *Threedimensional optical tomography: resolution in small-object imaging*, Appl. Opt. 2003; 42(16), 3117-3128.
- [52] M. Patachia, D. C. A. Dutu, and D. C. Dumitras, *Blood oxygenation monitoring by diffuse optical tomography*, Quantum Electronics. 2010; 40(12), 1062-1066.
- [53] T. D. O'Sullivan, A. E. Cerussi, D. J. Cuccia, and B. J. Tromberg, *Diffuse optical imaging using spatially and temporally modulated light*, J. Biomed. Opt. 2012; 17(7), 071311.
- [54] J. Schmitt, *Optical coherence tomography (OCT): a review*, IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 1999; 5(4), 1205-1215.
- [55] G. Le Tolguenec, F. Devaux, E. Lantz, *Two-dimensional time-resolved direct imaging through thick biological tissues: a new step toward noninvasive medical imaging*, Opt. Lett. 1999; 24(15), 1047-1049.
- [56] Unterhuber, B. Povazay, B. Hermann, H. Sattmann, W. Dexler, V. Yakovlev, G. Tempea, C. Schubert, E.M. Anger, P.K. Ahnelt, M. Stur, J.E. Morgan, A. Cowey, G.

- Jung, and A. Stingl, *Compact, low-cost Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> laser for in vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography*, *Opt. Lett.* 2003; 28, 905–907.
- [57] J. Allen, *Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement*, *Physiol. Meas.* 2007; 28(3), R1–R39.
- [58] S. Hu, J. Zheng, V. Chouliaras, and R. Summers, *Feasibility of imaging photoplethysmography*, in *Proceedings of IEEE Conference on BioMedical Engineering and Informatics*. 2008; p. 72–75.
- [59] K. H. Shelley, *Photoplethysmography: beyond the calculation of arterial oxygen saturation and heart rate*, *Anesth. Analg.* 2007; 105(6) S31-S36.
- [60] J. Walsh, J. Cummings, *Effect of the dynamic optical properties of water on midinfrared laser ablation*, *Lasers Surg. Med.* 1994; 15(3), 295-305.
- [61] E. Jansen, T. van Leeuwen, M. Motamedi, C. Borst, A. Welch, *Temperature dependence of the absorption coefficient of water for midinfrared laser radiation*, *Lasers Surg. Med.* 1994; 14(3), 258-268.
- [62] M. Strojnik, G. Paez, E. Alatorre-Alvarez, *Numerical modeling of tooth response to laser pulse irradiation*, in *Unconventional Imaging II*, V. Gamiz, P. Idell, M. Strojnik, Eds., *Proc. SPIE 6307*, Bellingham (WA), 63070J. 2006.
- [63] M. Strojnik, *Geometrical and temporal scale factors for thermal damage studies in a tooth*, in *Infrared Spaceborne Remote Sensing and Instrumentation XV*, M. Strojnik, Ed., *Proc. SPIE 6678*, Bellingham (WA), 66781Q. 2007.
- [64] D. Dolmans, D. Fukumura, R. Jain. *Photodynamic therapy for cancer*, *Rev. Nac. Cancer* 3(5), 2003; 380-387.
- [65] S. Mathai, T. Smith, K. Ghiggino, *Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6(9), 2007; 995-1002.
- [66] C. Bühler, P. Ngaotheppitak, D. Fried, *Imaging of occlusal dental caries (decay) with near-IR light at 1310-nm*, *Opt. Express* 13(2), 2005; 573-582.
- [67] G. Jarry, L. Poupinet, J. Watson, T. Lepine. *Extinction measurements in diffusing mammalian tissue with heterodyne detection and a titanium:sapphire laser*, *Appl. Opt.* 34(12), 1995; 2045-2054.
- [68] Gavira, M., Perez, G., Acha, C. *Estudio comparativo del efecto de las propiedades ópticas del revestimiento exterior de fachada sobre la demanda energética de un edificio*. *DYNA*, 93(2). 2018; 216-220.
- [69] ThorLabs, Compact Laser Modules with Phono Jack. [internet] [consultado 02 de julio de 2021] Disponible en:  
[https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=1487#368](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=1487#368)
- [70] SOLIDWORKS. Qué es y para qué sirve [internet] [Consultado 02 de julio de 2021] Disponible en: <https://solid-bi.es/solidworks/>
- [71] Asociación de Investigación Técnica de las Industrias de la madera. *Tableros de fibras MDF*. Consejo Superior de Arquitectos Entidad colaboradora. 2015.
- [72] Masisa. Ficha Técnica MDF [Internet]. [Consultado 03 de abril de 2022]. Disponible en: <https://mexico.masisa.com/producto/mdf-2/>

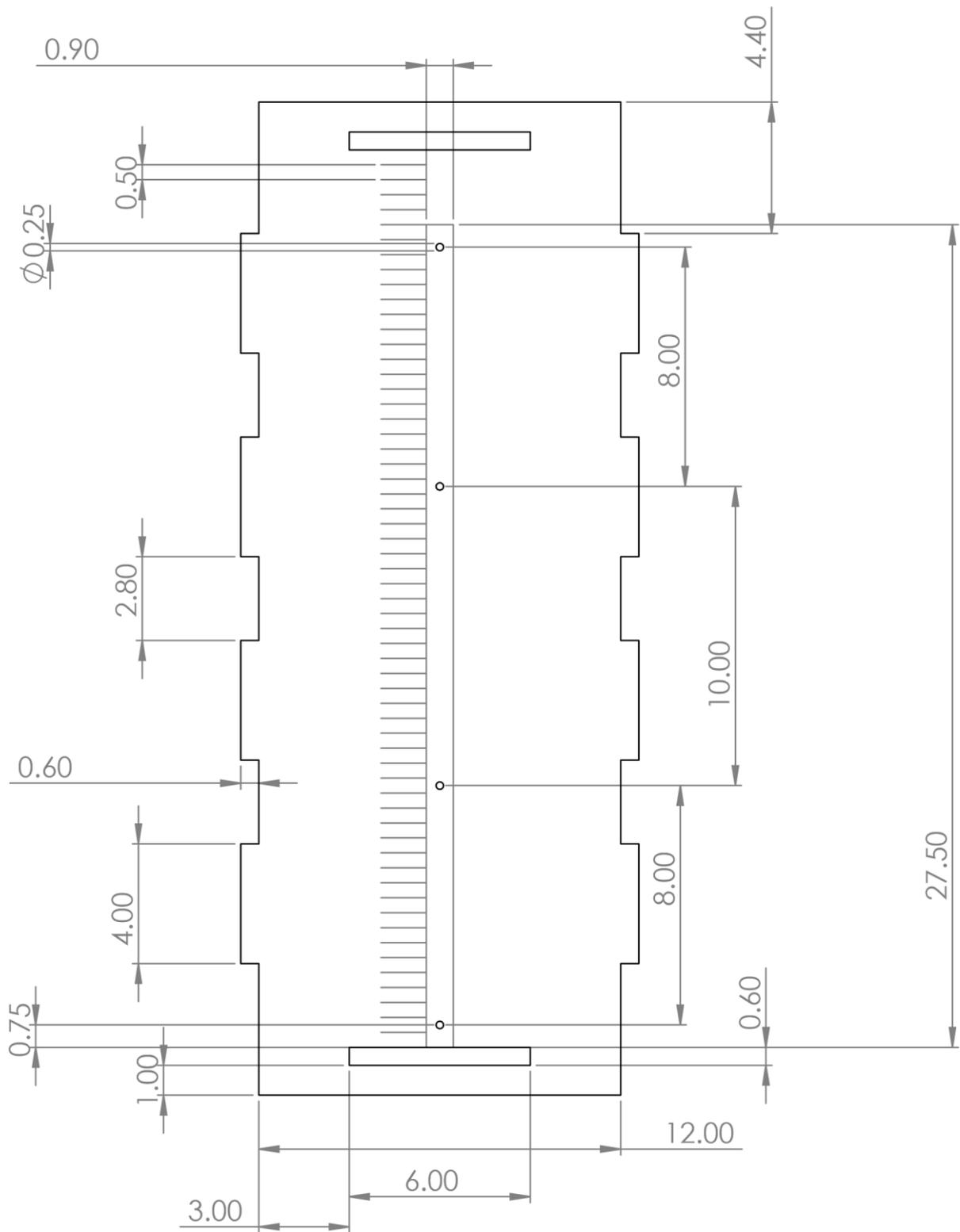
- [73] Lossada, F. *El color y sus armonías*. Publicaciones Vicerrectorado Académico, Universidad de las Andes. 2012.
- [74] 4 pinzas Metal Pantalla Celular Clip Sujetadora Prensa Touch. Mercado Libre. [Figura] Recuperado de: [https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-1307532922-4-pinzas-metal-pantalla-celular-clip-sujetadora-prensa-touch-JM#position=1&search\\_layout=grid&type=item&tracking\\_id=caaa0fe3-4e28-4fa1-b739-9328f7453e28](https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-1307532922-4-pinzas-metal-pantalla-celular-clip-sujetadora-prensa-touch-JM#position=1&search_layout=grid&type=item&tracking_id=caaa0fe3-4e28-4fa1-b739-9328f7453e28)
- [75] Optical Tables, Breadboards, and Supports [internet] [Consultado el 05 marzo de 2022] Disponible en: [https://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide\\_id=40](https://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide_id=40)
- [76] Garen. Lámina de ACRÍLICO CELL-CAST. [Ficha técnica] 2021.
- [77] Gil, L. *Estudio comparativo de las diferentes propiedades físicas de los polímeros acrílicos utilizados como bases protéticas*. Universidad Complutense [Tesis] 2003.
- [78] Flores-Reyes, M., Torres-García, E., Oros-Pantoja, R. *Femur absorptiometry changes determined by X-ray image segmentation in mice under experimental diabetes and ovariectomy*. Applied Radiation and Isotopes, Elsevier. 2021.

## Anexo 1: Planos del dispositivo (medidas en cm)

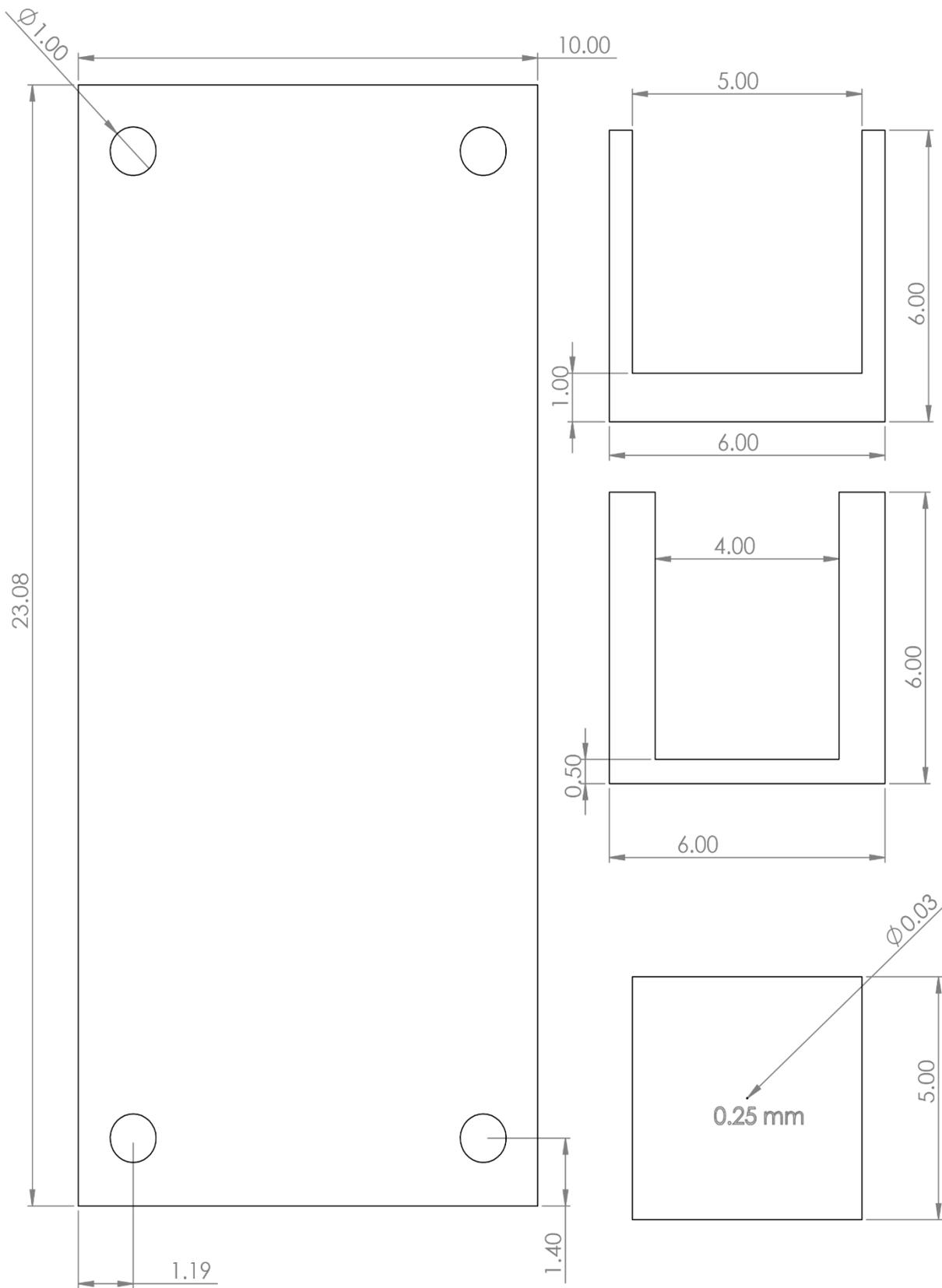
- Anclaje de la mesa



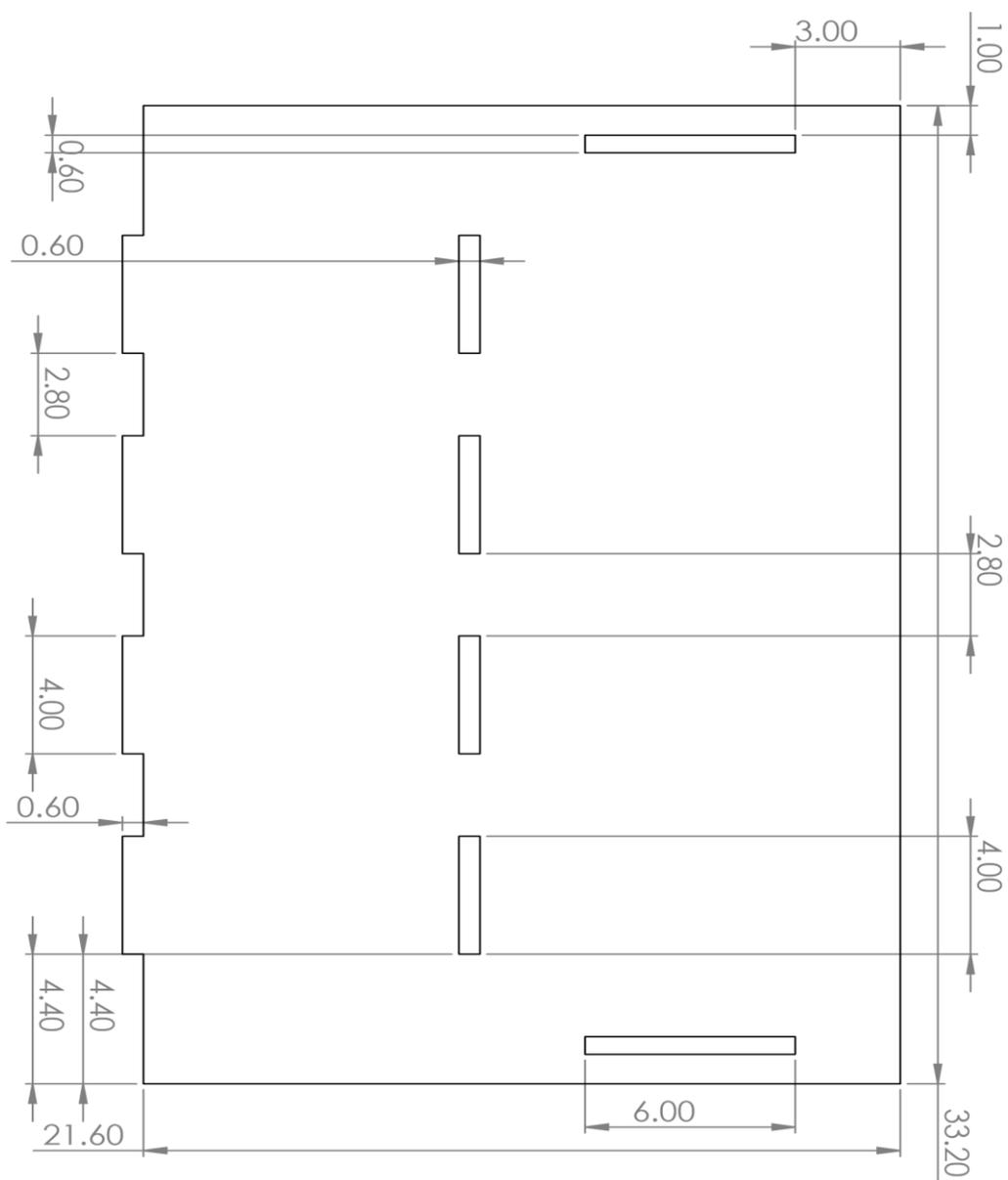
- Base del dispositivo



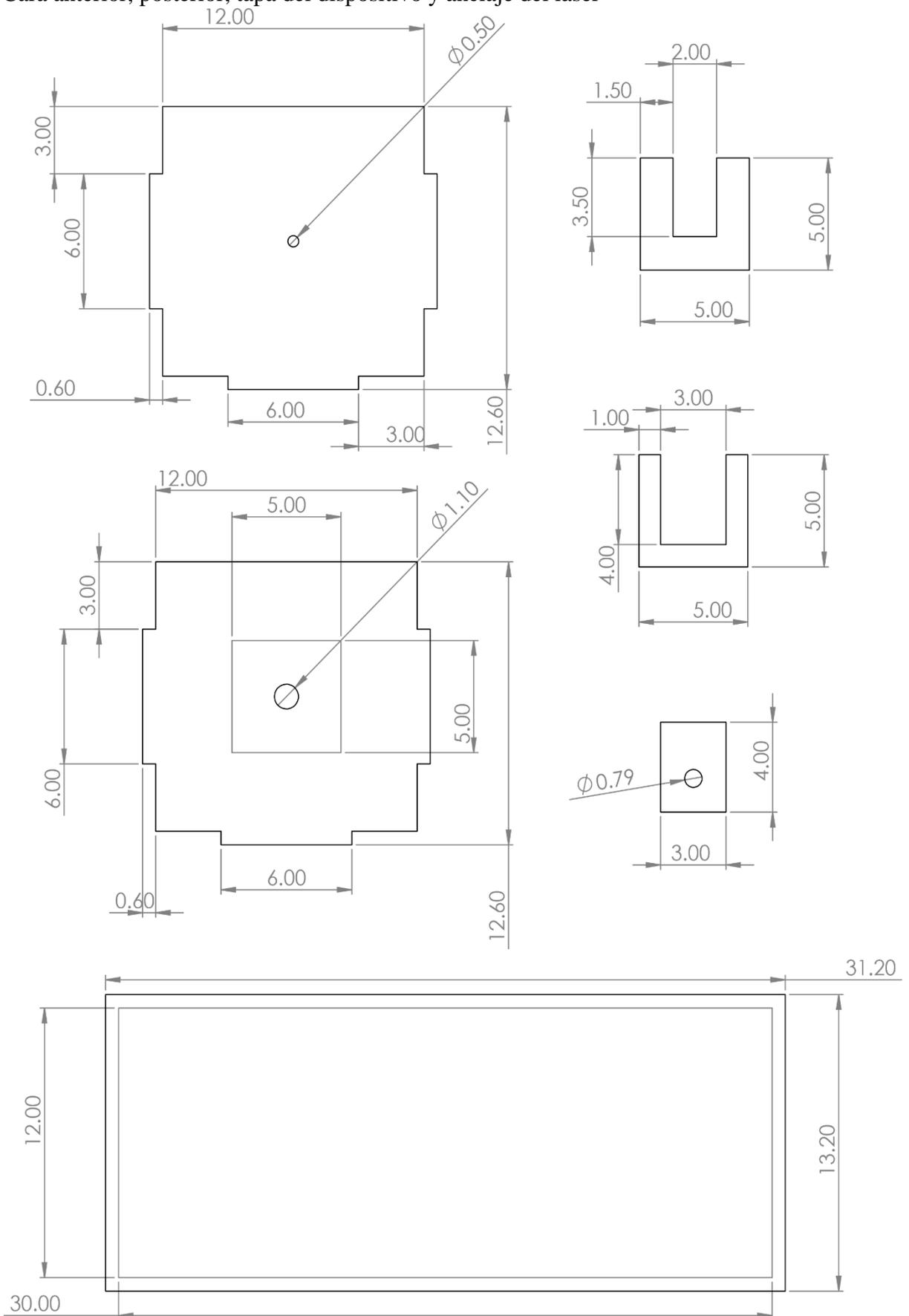
- Base del espectrofotómetro y colimador del haz



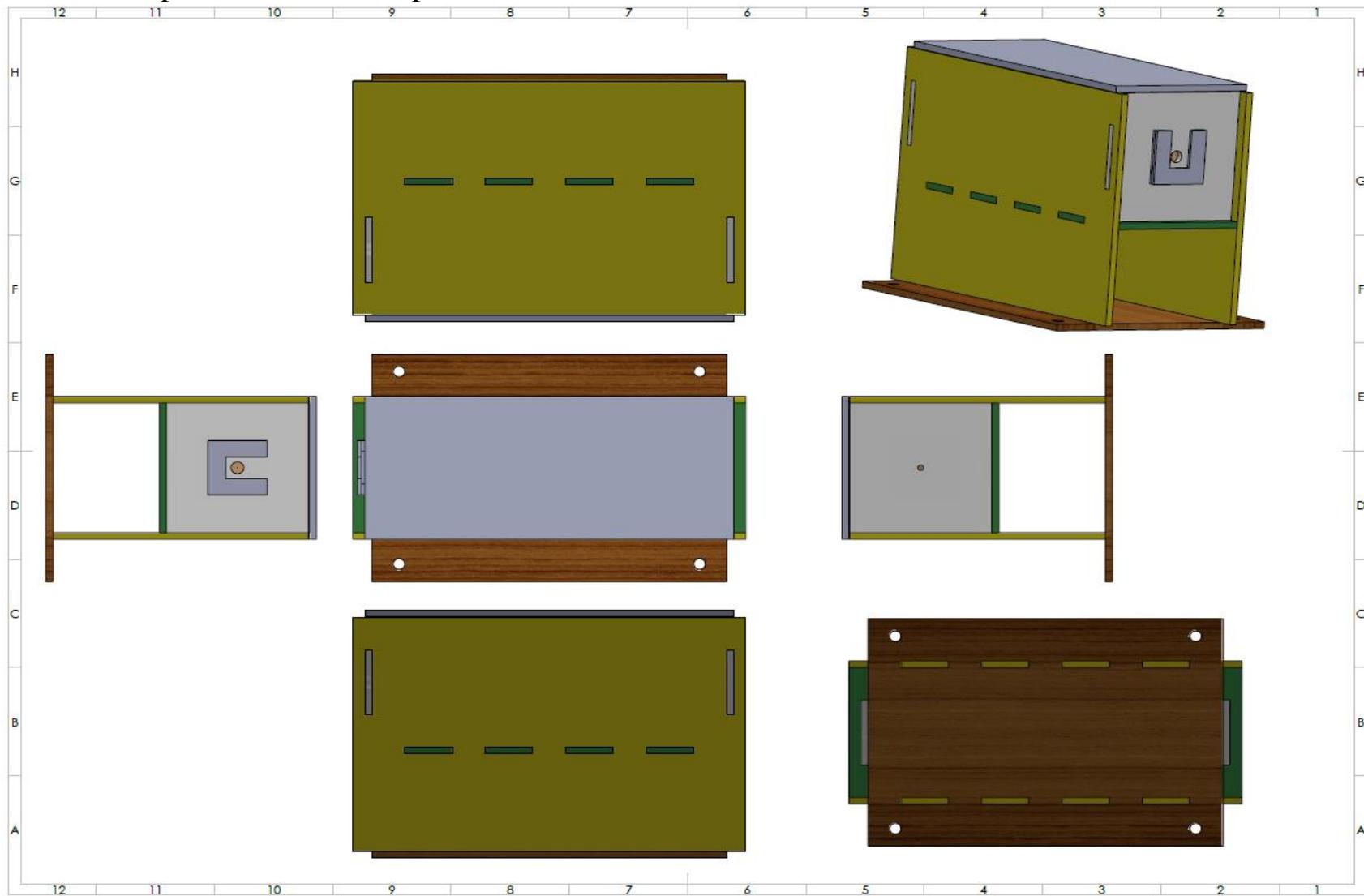
- Cara lateral del dispositivo (x2)



- Cara anterior, posterior, tapa del dispositivo y anclaje del láser



## Anexo 2: Plano explosionado del dispositivo



## Anexo 3: Código para calcular los picos máximos de las pruebas en Matlab®

- Las variables cambian de acuerdo con cada laser, en este código se utilizó el láser de 850nm

```
% %Elaborado por: ANGELICA PAOLA PEREZ JIMENEZ / EDWIN ARTURO CAPULA
% VELÁZQUEZ
%LASER 850nm
close all
clear all
Fondo=importdata('FONDO_850nm.xlsx'); %% leer las 5 señales de
ruido
MeanFondo=mean(Fondo,2); %Promediando matriz ruido por X tiempo
L1=1305; %Limite corte 1
L2=1335; %Limite corte 2
for v=1:10
    if v==1
        Crudo=importdata('3um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 850nm
        l=3;
    end
    if v==2
        Crudo=importdata('5um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 5um con láser de 850nm
        l=5;
    end
    if v==3
        Crudo=importdata('7um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 7um con láser de 850nm
        l=7;
    end
    if v==4
        Crudo=importdata('10um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 10um con láser de 850nm
        l=10;
    end
    if v==5
        Crudo=importdata('12um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 12um con láser de 850nm
        l=12;
    end
    if v==6
        Crudo=importdata('16um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 16um con láser de 850nm
        l=16;
    end
    if v==7
        Crudo=importdata('20um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 20um con láser de 850nm
        l=20;
    end
end
```

```

        if v==8
            Crudo=importdata('25um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 25um con láser de 850nm
            l=25;
        end
        if v==9
            Crudo=importdata('30um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 30um con láser de 850nm
            l=30;
        end
        if v==10
            Crudo=importdata('35um_850nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 35um con láser de 850nm
            l=35;
        end

A=Crudo; %Generar matriz para mis datos en crudo

for i = 1:5 %%Restando promedio del ruido, elemento elemento de
vector (fondo)
    A(:,i*2)=Crudo(:,i*2)-MeanFondo(:,1);
end

figure
plot(A(L1:L2,1),A(L1:L2,2),'g-'); %Test 1
grid on
hold on
plot(A(L1:L2,1),A(L1:L2,4),'r-'); %Test 2
hold on
plot(A(L1:L2,1),A(L1:L2,6),'b-'); %Test 3
hold on
plot(A(L1:L2,1),A(L1:L2,8),'y-'); %Test 4
hold on
plot(A(L1:L2,1),A(L1:L2,10),'m-'); %Test 5
hold on

title(['Laser 850nm / Corte ' num2str(l) ' nm'])
xlabel('Nanometros')
ylabel('Fotones')
legend('Test 1','Test 2','Test 3','Test 4','Test 5');

%%Encontrar picos
pksmx5=zeros(1,5);
for i = 1:5 % for para encontrar el pico maximo de cada señal
    pksmx5(1,i)=max(A(L1:L2,(i*2))); % comando para
encontrar el pico maximo
    indices=find(A(:,i*2)==pksmx5(1,i));
    indices=A(indices,(i*2)-1);
    plot(indices,pksmx5(1,i),'r*') ;
    hold on
end
error(v)=std(pksmx5); % calcular la desviacion estandar de cada
corte

pk_s_mean_405(1,v)=mean(pksmx5);
plot(indices,pk_s_mean_405(1,v),'b*') ;
end

```

```
l=[3 ; 5; 7; 10 ; 12; 16 ; 20; 25 ; 30; 35];  
figure  
plot(l,pks_mean_405,'r','linewidth',2)  
title('Laser 850nm ')  
xlabel('Cortes um')  
ylabel('Fotones máx')
```

## Anexo 4: Código para calcular el área bajo la curva de las pruebas en Matlab®

- Las variables cambian de acuerdo con cada laser, en este código se utilizó el láser de 980nm

```
% %Elaborado por: ANGELICA PAOLA PEREZ JIMENEZ / EDWIN ARTURO CAPULA
% VELÁZQUEZ
%LASER 980nm
clear all
close all
Fondo=importdata('FONDO_980nm.xlsx'); %% leer las 5 señales de ruido
MeanFondo=mean(Fondo,2); %Promediando matriz ruido por X tiempo
L1=1560;%limite corte 1 (se ajusta para cada láser)
L2=1580;%limite corte 2 (se ajusta para cada láser)
for v=1:10

    if v==1
        Crudo=importdata('3um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=3;
    end
    if v==2
        Crudo=importdata('5um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=5;
    end
    if v==3
        Crudo=importdata('7um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=7;
    end
    if v==4
        Crudo=importdata('10um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=10;
    end
    if v==5
        Crudo=importdata('12um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=12;
    end
    if v==6
        Crudo=importdata('16um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=16;
    end
    if v==7
        Crudo=importdata('20um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=20;
    end
    if v==8
```

```

        Crudo=importdata('25um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=25;
    end
    if v==9
        Crudo=importdata('30um_980nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=30;
    end
    if v==10
        Crudo=importdata('35um_98nm.xlsx'); %% leer las 5 mediciones
para corte de 3um con láser de 980nm
        l=35;
    end

A=Crudo(:,1);
prom=Crudo(:,2)+Crudo(:,4)+Crudo(:,6)+Crudo(:,8)+Crudo(:,10); % suma mis
5 mediciones

prom1=prom(:,1)/5; % saca el promedio de mis 5 mediciones

%%Calculo del error
Crudo(:,2)=Crudo(:,2)-MeanFondo(:,1);
Crudo(:,4)=Crudo(:,4)-MeanFondo(:,1);
Crudo(:,6)=Crudo(:,6)-MeanFondo(:,1);
Crudo(:,8)=Crudo(:,8)-MeanFondo(:,1);
Crudo(:,10)=Crudo(:,10)-MeanFondo(:,1);
integral(1)=trapz(Crudo(L1:L2,2));
integral(2)=trapz(Crudo(L1:L2,4));
integral(3)=trapz(Crudo(L1:L2,6));
integral(4)=trapz(Crudo(L1:L2,8));
integral(5)=trapz(Crudo(L1:L2,10));
err(v)=std(integral);

clc
A(:,2)=prom1;
A(:,2)=prom1(:,1)-MeanFondo(:,1);

B=(A(L1:L2,:)); %guarda en otra matriz los datos relevantes de la
exponencial 980
plot(A(L1:L2,1),A(L1:L2,2),'ro');
grid on
title('Corte 3-35um / laser 980nm')
xlabel('Nanometros')
ylabel('Fotones')
hold on
x=A(L1:L2,1);
y=A(L1:L2,2);

p=polyfit(x,y,5); %Crea un polinomio de segundo grado con los vectores de
x y y
xp=974.5:0.5:984.5; %crea un vector auxiliar
yp=polyval(p,xp); %evalua el polinomio con el vector auxiliar
%
z(v)=trapz(yp);% saca la integral de nuestro polinomio calculado
w(v)=trapz(B(:,2)); % saca la integral de nuestros datos promediados

```

```
plot(xp,yp,'b','linewidth',2) %grafica en azul la funcion del polinomio,  
es como normalizar la grafica
```

```
hold on
```

```
plot(A(L1:L2,1),A(L1:L2,2),'-g'); %exponencial 400-415  
legend('Datos crudos','Funcion(polinomio)','Union datos crudos')  
end  
l=[3 ; 5; 7; 10 ; 12; 16 ; 20; 25 ; 30; 35];  
figure  
plot(l,z,'r','linewidth',2)  
title('Laser 980nm ')  
xlabel('Cortes um')  
ylabel('Fotones máx')  
figure  
plot(l,w,'r','linewidth',2)  
title('Laser 980nm con vector original ')  
xlabel('Cortes um')  
ylabel('Fotones máx')
```