

MEDICIONES Y SIMULACIONES DE LOS
PROCESOS DE PROPAGACIÓN DE LA
LUZ EN MODELOS FÍSICOS DE TEJIDO
BIOLÓGICO BLANDO

Measurements and simulations of light
propagation processes in physical models of soft
biological tissue

Carolina Fajardo Vega
Código 201539514

Trabajo de Grado dirigido por
Prof. Efraín Solarte Rodríguez, Dr. rer. nat.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE FÍSICA
SANTIAGO DE CALI
Agosto de 2021

Índice

Resumen

Abstract

1. Introducción	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. Hipótesis	5
4. Marco teórico/experimental y estado del arte	5
4.1. Marco teórico	5
4.1.1. Absorción	6
4.1.2. Scattering o esparcimiento	6
4.1.3. Propiedades ópticas de un medio turbio	7
4.1.4. Teoría de Transporte Radiativo	8
4.1.5. Modelo de Kubelka-Munk	10
4.1.6. Ecuación de Difusión (DE)	11

4.1.7.	Ecuación de Correlación de Difusión (CDE)	13
4.2.	Marco Experimental	15
4.2.1.	“ <i>Phantoms</i> ” de tejido biológico blando	15
4.2.2.	Espectroscopía UV-VIS	16
4.2.3.	Espectroscopía NIR: Espectroscopía de Correlación Difusa	18
4.2.4.	Ventana Óptica Biológica (VOB)	20
4.3.	Estado del arte	20
4.3.1.	Métodos ópticos de imagenología médica	21
4.3.2.	Sobre los modelos físicos de los tejidos	22
5.	Metodología y Procedimiento Experimental	25
5.1.	Preparación de los <i>phantoms</i>	25
5.2.	Montaje experimental	26
5.3.	Caracterización de los <i>phantoms</i>	28
5.4.	Obtención de las propiedades ópticas de los <i>phantoms</i>	31
5.5.	<i>Phantom</i> pulsátil	33
5.5.1.	Preparación del <i>phantom</i>	33
5.5.2.	Montaje experimental	33
5.5.3.	Caracterización del <i>phantom</i>	35

5.5.4. Obtención del BFi del <i>phantom</i> pulsátil	36
6. Resultados y Análisis	36
6.1. Caracterización espectroscópica de <i>phantoms</i> de bajo costo . .	36
6.2. Caracterización del <i>phantom</i> pulsátil	45
7. Conclusiones y Perspectivas	51
A. Anexos	53
A.1.	53
A.2.	54
A.3.	56
A.3.1. Participación en eventos modalidad poster	56
A.3.2. Participación en eventos modalidad presentación oral .	56
A.3.3. Publicaciones	56
A.3.4. Reconocimientos	57

Índice de figuras

1.	Procesos de propagación de la luz en tejidos biológicos.	6
2.	Representación de los dos flujos en el modelo de KM.	10
3.	Composición básica de un <i>phantom</i>	15
4.	Montaje típico para medir absorbancia/transmitancia.	17
5.	Representación esquemática de un espectrómetro UV-VIS. . .	18
6.	Esquema estándar de un equipo de DCS.	19
7.	Coefficiente de extinción vs. longitud de onda para oxihemoglobina, desoxihemoglobina y agua.	20
8.	Ejemplo de mediciones de fastDCS.	22
9.	Algunos <i>phantoms</i> pulsátiles.	24
10.	Materiales usados para la preparación de los <i>phantoms</i>	26
11.	Montaje experimental transmitancia colimada.	27
12.	Montaje experimental mediciones difusas.	28
13.	Montaje experimental mediciones de fluorescencia.	28
14.	Barra de herramientas de SpectraSuite®.	29
15.	Protocolo de caracterización de los <i>phantoms</i>	30
16.	Barra de herramientas del software ORIGINPRO®.	31
17.	Protocolo de estimación de las constantes ópticas.	32

18.	Equipo de fastDCS (ICFO) y sonda de medición.	34
19.	Montaje experimental <i>phantom</i> pulsátil.	35
20.	Intensidad vs. longitud de onda (espectroscopia VIS).	37
21.	Transmitancia colimada vs longitud de onda para <i>phantoms</i> de distintas concentraciones.	37
22.	Mediciones de reflectancia difusa para <i>phantoms</i> de diferentes concentraciones.	38
23.	Mediciones de transmitancia difusa para diferentes concentraciones de lípido.	39
24.	Coeficiente de extinción total vs longitud de onda para diferentes concentraciones de lípido.	40
25.	Razón de los coeficientes de Kubelka Munk K/S vs. longitud de onda.	41
26.	Constantes ópticas vs. longitud de onda para <i>phantoms</i> de 1,0 % de lípido.	41
27.	Mediciones de transmitancia colimada de los <i>phantoms</i> con la adición de tinta china roja.	42
28.	Coeficiente de extinción total vs longitud de onda para diferentes concentraciones de tinta.	42
29.	Espectro de fluorescencia.	43
30.	Fotografías de la fluorescencia observada.	44
31.	VOB en las mediciones de leche entera 3 % grasa.	44
32.	Caudal vs. velocidad de la bomba.	45

33.	Función de autocorrelación temporal medida para distintas velocidades de la bomba.	46
34.	Caracterización del comportamiento pulsátil.	47
35.	Mediciones sin flujo (0 <i>rpm</i>).	47
36.	Comparación del ajuste con los tres modelos para 24 <i>rpm</i> . . .	48
37.	BFi vs. tiempo para los distintos modelos (24 <i>rpm</i>).	49
38.	Comparación de los tres modelos para curvas sistólicas y diastólicas.	49
39.	Comparación del ajuste con distintas geometrías (24 <i>rpm</i>). . .	50
40.	Transformada de Fourier del BFi para diferentes velocidades de flujo.	50
41.	Constantes ópticas para tejidos reales.	53
42.	Comparación del ajuste con los tres modelos de flujo.	54
43.	BFi vs tiempo: protocolo oclusión arterial de brazo.	55
44.	Transformada de Fourier del BFi para las tres etapas del protocolo.	55

Índice de tablas

1.	Desplazamiento cuadrático medio para distintos modelos de flujo.	14
2.	Funciones de Green solución a la CDE para diferentes condiciones de frontera.	15
3.	Notación para cada solución de la CDE.	53

Resumen

El estudio de la óptica tisular es relevante para el desarrollo de técnicas diagnósticas y terapéuticas innovadoras y no invasivas en el caso de patologías como el cáncer y eventos de accidente cerebrovascular, y se requiere de *phantoms* ópticos que simulen los procesos de propagación de la luz a través del tejido biológico blando para evaluar el rendimiento y calibrar diferentes modalidades de imagenología médica. En este trabajo se prepararon *phantoms* líquidos de bajo costo basados en lípidos, se eligió leche de vaca como el material esparcidor, tinta china roja como el medio absorbedor y agua desmineralizada como el medio matriz ya que provee un medio suave biológicamente compatible con la adición de moléculas orgánicas. Para la caracterización de este modelo simple de tejido blando se llevaron a cabo dos experimentos de espectroscopía en el rango visible. En el primero se midieron los espectros de transmitancia colimada y difusa y reflectancia difusa utilizando *phantoms* compuestos por leche con distintos contenidos de grasa. Con los datos se estimaron las propiedades ópticas de los *phantoms* de tejido, se obtuvo la dependencia con la longitud de onda del coeficiente de extinción y de la razón de Kubelka Munk. En el segundo se observó el efecto de sus componentes con mediciones de transmitancia colimada. El pico de absorción aumenta al añadir tinta a los *phantoms* de leche; y al variar la concentración de lípido manteniendo la tinta constante, el scattering se incrementa. Se determinó la dependencia del coeficiente de extinción con la longitud de onda, y se observaron efectos de fluorescencia. Usando un protocolo simple basado en la geometría laminar para la aproximación de difusión se estiman los coeficientes efectivos de absorción y scattering, y los resultados confirman la posibilidad de la identificación espectroscópica de los tipos de leche, así como la viabilidad de *phantoms* controlables de bajo costo para estudios preliminares de biofotónica, que permiten su uso para aprender las técnicas de la espectroscopia difusa y su aplicación a la caracterización óptica de medios turbios. Además, se construyó un *phantom* pulsátil líquido basado en intralípido, con propiedades ópticas conocidas, para la evaluación de la pulsatilidad en las mediciones de flujo sanguíneo realizadas con la técnica de espectroscopía en el infrarrojo cercano: Espectroscopía de Correlación Difusa.

Palabras clave: espectroscopía, medios turbios, biofotónica, óptica médica.

Abstract

The study of tissue optics is relevant for developing innovative non-invasive diagnostic and therapeutic techniques for pathologies such as cancer and stroke events and optical *phantoms* that simulate light propagation processes through soft biological tissue are required to evaluate the performance and calibrate different medical imaging modalities. In this project liquid lipid based low-cost phantoms were prepared, using cow's milk as scattering material, red India ink as the absorbing material and demineralized water as the matrix material since it provides a soft medium biologically compatible with the addition of organic molecules. For the characterization of this simple soft tissue model two spectroscopy experiments in the visible range were carried out. In the first one, collimated and diffuse transmittance and reflectance spectra were measured using phantoms with milk of different fat content. From the data, optical properties of tissue-like phantoms could be estimated, dependence between extinction coefficient and Kubelka Munk's ratio on the wavelength was obtained. In the second experiment the effect of the phantom components was observed using collimated transmittance. The absorption peak increases as ink was added to milk phantoms; and when lipid concentration was varied, by fixed ink, the scattering grows. The extinction coefficient's dependence on the wavelength was determined, and fluorescence effects were observed. Phantoms' effective absorption and scattering coefficient could be estimated using a simple protocol based on a slab geometry for the diffusion approximation and results confirm the possibility of spectroscopic identification of milk kinds, as well as the feasibility of low cost controllable phantoms for preliminary biophotonic studies, which allows its use to learn the techniques of diffuse spectroscopy and its application to optical characterization of turbid media. Furthermore, a liquid intralipid based pulsatile phantom, with known optical properties, was built for the assessment of pulsatility in blood flow measurements performed using the near-infrared spectroscopic technique: Diffuse Correlation Spectroscopy.

1. Introducción

El láser, por sus múltiples aplicaciones ha revolucionado distintas ramas de la ciencia, entre ellas se encuentra la biofotónica, que se define como una fusión entre la fotónica y las ciencias biomédicas y estudia la interacción luz-materia biológica [1], es decir, los fenómenos de reflexión, absorción y esparcimiento o *scattering*, tanto a nivel molecular como a nivel macroscópico. La base macroscópica de la materia biológica son los tejidos, un bioensamble organizado de células especializadas que llevan a cabo un trabajo fisiológico coordinado. Se clasifican de acuerdo a su elasticidad en: duros o calcificados, y blandos, que a su vez presentan dos categorías de acuerdo a sus propiedades ópticas: altamente dispersivos (opacos) y débilmente dispersivos (transparentes). Además, se caracterizan óptica y macroscópicamente por sus coeficientes de absorción, reflexión, scattering y anisotropía [2].

Para la determinación de los coeficientes ópticos de un material se requiere de una teoría que modele la interacción entre la luz y el medio [3]. En el caso de los tejidos, que son medios turbios, los procesos que determinan la propagación de la luz a través de ellos son la absorción y el scattering. Se pueden describir los mismos de dos maneras, la primera hace uso de las ecuaciones de Maxwell teniendo en cuenta la naturaleza ondulatoria de la luz y las propiedades microscópicas del medio, lo que la hace muy rigurosa y de alto costo computacional, y la segunda, que es la más empleada, hace uso de la Ecuación de Transporte Radiativo (RTE) desarrollada por Chandrasekhar, que tiene en cuenta la naturaleza corpuscular de la luz [4]. Debido a su complejidad, para resolver la RTE se han considerado diversos métodos con distinto grado de dificultad y precisión, uno de los más populares debido a su simplicidad para la estimación de los parámetros ópticos a partir de mediciones experimentales es el modelo fenomenológico de dos flujos de Kubelka Munk (KMM), que puede ser considerado una primera aproximación a la solución completa de la RTE [5].

Una de las razones para el desarrollo de técnicas y modelos teóricos en biofotónica es el problema del cáncer. De acuerdo a la IARC (International Agency for Research on Cancer) uno de cada cinco hombres y una de cada seis mujeres en el mundo desarrollaran cáncer a lo largo de su vida [6]. Por esta, y otras

patologías de alta morbilidad el estudio de la óptica de tejidos es tan importante en la actualidad, ya que es una necesidad diseñar tecnologías innovadoras no invasivas de diagnóstico y tratamiento, que son facilitadas con técnicas y tecnologías ópticas. Con el fin de desarrollar estas tecnologías se requiere de *phantoms*, modelos físicos que simulan las propiedades ópticas de los tejidos biológicos, para poner a prueba diseños de sistemas, comparar el rendimiento entre ellos, optimizar las señales y realizar control de calidad. La composición de un phantom de tejido blando consiste generalmente en un medio esparcidor, un medio absorbedor y un diluyente. La elección para absorbedores varía desde hemoglobina y células hasta tinta y tintes moleculares; los esparcidores se escogen dependiendo del tejido y su entorno, siendo los más comunes emulsiones basadas en lípidos, polvos de óxido de titanio o aluminio y microesferas poliméricas, y los diluyentes son típicamente agua, gelatina, silicona, alcohol de polivinilo, entre otros [7]. En general, los componentes un modelo se definen de acuerdo al tipo de tejido que se busca simular y a la técnica que se va a emplear.

Dentro de las técnicas de imagenología médica se encuentra la tomografía, que es un método para producir una imagen tridimensional de la estructura interna de un objeto sólido al observar y medir las diferencias en los efectos en la trayectoria de una onda incidente, cuyas aplicaciones incluyen oftalmología, cardiología, gastroenterología, urología, dermatología, odontología y neurociencia [8]. Entre las modalidades más utilizadas se encuentran la Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) y Tomografía Óptica Difusa (DOT), la primera basada en la retrodispersión o reflexión difusa de luz que se encuentra típicamente en el infrarrojo cercano presentando una resolución muy alta ($>1\ \mu\text{m}$) y una profundidad $>1\ \text{mm}$ [9], y la segunda utiliza luz en la región espectral NIR (Infrarrojo Cercano) para medir las propiedades ópticas de absorción y esparcimiento de tejidos biológicos monitoreando variaciones de la intensidad de luz transmitida y reflejada permitiendo así observar cambios en la concentración de hemoglobina oxigenada y desoxigenada [10] con una resolución espacial $> 100\ \mu\text{m}$ y profundidad de penetración entre 3 y 5 cm [9].

Modalidades tomográficas novedosas como la tomografía óptica de contraste de speckle (SCOT) y espectroscopía óptica de contraste de speckle (SCOS) hacen parte de LSCI (Laser Speckle Contrast Imaging) pues se basan en el análisis de contraste de speckle, que son patrones de intensidad producidos

al iluminar un medio difuso por el efecto de interferencia aleatoria entre un conjunto de ondas reflejadas o esparcidas desde diferentes partes del tejido iluminado. Si hay movimiento en el medio los speckles fluctuarán en intensidad proporcionando información acerca del movimiento de los centros dispersores, por ejemplo, del flujo sanguíneo [11–13]. Básicamente consisten en iluminar la muestra con luz láser y obtener las imágenes con una cámara o arreglo de cámaras digitales CCD (Charge-Coupled Device), o CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) para distintos tiempos de exposición, luego se procesan y analizan ajustando los datos a un modelo de difusión [12–14].

Otra tecnología que aplica la teoría de difusión y permite medir el movimiento de los scatterers basándose en el speckle dinámico es la Espectroscopía de Correlación Difusa (DCS), que ha sido desarrollada para medir directamente variaciones del flujo sanguíneo en microvasculatura de tejidos profundos [15], ya que los patrones de speckle son sensibles al movimiento de glóbulos rojos. Ofrece las ventajas de penetración de DOS ($> 1\text{ cm}$) y además permite la evaluación de parámetros como el índice de flujo sanguíneo (BFI) en tejidos como tumores, cerebro, músculos [16]. Consta en un láser NIR de coherencia grande que se hace incidir en una muestra o tejido, un detector de conteo de fotones ubicado a un par de centímetros de la fuente y un correlacionador de hardware o software que cuantifica la estadística temporal de los speckles [15–17].

En este trabajo se preparó un conjunto de phantoms, para definir un phantom líquido, cuyas propiedades ópticas dependen fuertemente de parámetros como la concentración de absorbedores, el contraste del índice de refracción entre los elementos esparcidos y la longitud de onda de la luz [17], se eligió una solución de agua desmineralizada como medio diluyente, ya que provee un medio suave óptimo para estudios de laboratorio, tinta como medio absorbedor y leche como esparcidor, ya que son biológicamente similares a lo que se piensa que genera esparcimiento en los tejidos, llamada la bicapa lipídica de células y los organelos [7]. Se procedió a caracterizar los *phantoms* de distintas concentraciones mediante experimentos de reflectancia y transmitancia utilizando una fuente de luz en el rango visible.

Adicionalmente, se realizó un montaje para un phantom líquido pulsátil, con propiedades ópticas conocidas, que permite la evaluación de la pulsatilidad en

las mediciones de “flujo sanguíneo” realizadas con la técnica de espectroscopía en el infrarrojo cercano: espectroscopía de correlación difusa rápida (*fast DCS*).

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo fueron diseñados originalmente para ser desarrollados en el laboratorio de Óptica de la Universidad del Valle; sin embargo, durante el desarrollo de la pasantía de investigación en el Instituto de Ciencias Fotónicas (ICFO), obtenida como un premio especial por la presentación de los resultados preliminares del trabajo de grado, se terminó y se complementó con el diseño y caracterización de un phantom de medio pulsátil.

2.1. Objetivo general

Diseñar, desarrollar y montar un arreglo óptico que permita el estudio de los procesos de propagación de la luz en un sistema físico que simule un tejido biológico blando (*phantom*) y conocer las limitaciones del medio.

2.2. Objetivos específicos

1. Diseñar y montar un sistema óptico para la caracterización de muestras de medios turbios.
2. Preparar phantoms líquidos basados en distintas concentraciones de lípidos, utilizando tinta colorante para simular tejidos biológicos.
3. Caracterizar los phantoms de acuerdo a su reflectancia y transmitancia.
 - 3.1. Medir los espectros de luz transmitida y reflejada por las superficies del phantom.
 - 3.2. Calcular las constantes ópticas del medio usando el modelo de Kubelka-Munk.

- 3.3. Determinar el rango de la “Ventana Óptica Biológica” (VOB).
4. Medir posibles efectos de fluorescencia en función de las concentraciones de tinta y determinar sus características.

3. Hipótesis

El punto de partida de este trabajo está en considerar que los phantoms líquidos simulan las características ópticas de los tejidos biológicos blandos; así el modelo experimental que se diseñará, a partir de materiales comerciales y de bajo costo, permitirá caracterizar y determinar su rango VOB, lo que posibilita finalmente obtener las propiedades ópticas del tejido simulado a partir de mediciones espectroscópicas, mediante una aproximación simple a la solución de la ecuación de transporte radiativo. Además, tener una estimación adecuada de estas propiedades permite la utilización de distintas técnicas basadas en luz para monitorear de manera no invasiva diferentes factores en el ámbito clínico, como es el caso particular del flujo sanguíneo.

4. Marco teórico/experimental y estado del arte

4.1. Marco teórico

La base fundamental de la biofotónica es la interacción entre la luz y la materia biológica. A nivel macroscópico esta interacción produce procesos como absorción, refracción, reflexión y esparcimiento durante la propagación de la luz, y la naturaleza exacta de cada proceso depende en la estructura física y química del biomaterial. Un tipo de biomateriales son los tejidos, que son bioensambles organizados de células especializadas que llevan a cabo una función fisiológica coordinada y dentro de los tejidos blancos se encuentran tejido nervioso, muscular, epitelial y tejido conectivo [1]. La absorción y el

esparcimiento son los principales fenómenos que se dan en la interacción con tejidos blandos, por lo tanto los coeficientes de absorción μ_a y de scattering μ_s son los más importantes para caracterizar *phantoms* que simulen sus propiedades ópticas.

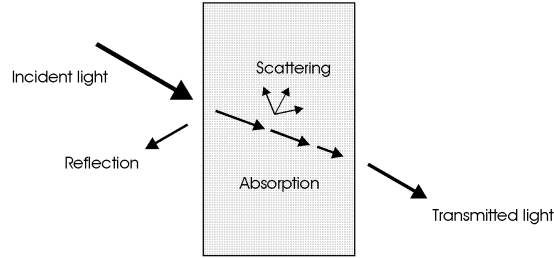


Figura 1: Procesos de propagación de la luz en tejidos biológicos [18].

4.1.1. Absorción

Está relacionada con las bandas de absorción de las moléculas y consiste en la absorción de un fotón de una energía determinada llevando un electrón a un estado excitado, y la relajación al estado base puede darse mediante un proceso no radiativo emitiendo calor o mediante efectos de luminiscencia emitiendo un fotón con mayor longitud de onda. El coeficiente de absorción μ_a [cm^{-1}] describe este fenómeno y se define como la razón entre la potencia absorbida por unidad de volumen y la potencia incidente por unidad de área [19].

4.1.2. Scattering o esparcimiento

Es el predominante en los tejidos ya que son medios turbios no homogéneos, y consiste en el cambio en la distribución espacial del haz de radiación resultando en una pérdida en su direccionalidad inicial así como un desenfoque del punto del haz. De acuerdo a si la interacción entre los fotones y las moléculas mantiene, aumenta o disminuye la energía incidente se puede clasificar como esparcimiento inelástico o elástico. El esparcimiento inelástico es débil en los tejidos biológicos, por lo que se consideran principalmente procesos elásticos como esparcimientos

del tipo Rayleigh o Mie, donde el primero se da con tamaños de partículas más pequeños que la magnitud de la longitud de onda de la luz y el segundo cuando son de tamaño comparable [1]. Este fenómeno se describe con el coeficiente de scattering μ_s [cm^{-1}] que se define de manera análoga al de absorción [19].

4.1.3. Propiedades ópticas de un medio turbio

Tanto la absorción como el esparcimiento generan una pérdida de intensidad de la luz al propagarse a través de un tejido que puede describirse utilizando un modelo de decaimiento exponencial comúnmente llamado ley de Beer-Lambert

$$I(z) = I_o e^{-\mu_t z} \quad (1)$$

Donde z es la longitud de camino óptico, profundidad o grosor de la muestra y

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

se define como el coeficiente total de extinción o atenuación; en algunos casos uno de los coeficientes puede ser despreciable respecto al otro dependiendo de la naturaleza del tejido, sin embargo es necesario tener en cuenta que ambos procesos están presentes, y un parámetro que es útil definir para describir la fracción de la potencia total extraída por scattering es el albedo óptico $\Lambda = \frac{\mu_s}{\mu_t}$. El camino óptico medio de los fotones incidentes se define como $l_{tr} = \frac{1}{\mu_t}$. [19, 20]

En la mayoría de tejidos biológicos se encuentra que los fotones se esparcen preferiblemente en la dirección hacia adelante, y esto no puede explicarse completamente con el esparcimiento Rayleigh, también se observa que la dependencia con la longitud de onda es más fuerte que la predicha por Mie, por lo tanto ninguno de los dos tipos describen completamente el esparcimiento en tejidos [20]. Por esta razón es conveniente definir una función densidad de probabilidad de que un fotón dispersado viajando en una dirección sea dispersado de nuevo dentro del ángulo sólido unitario en otra dirección, esta se conoce como la función de fase de scattering $p(\theta)$. De manera que si esta función no depende del ángulo se tiene scattering isotrópico mientras que cuando hay dependencia es anisotrópico y la medida de esta anisotropía está dada por el coeficiente o factor de anisotropía g , que se define como el coseno promedio del

ángulo de scattering θ [21]

$$g = \langle \cos\theta \rangle = 2\pi \int_0^\pi \cos\theta p(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (3)$$

Y $p(\theta)$ actúa como el peso estadístico de cada valor posible de θ . Cuando $g=0$ corresponde a esparcimiento Rayleigh, $g=1$ significa esparcimiento Mie total hacia adelante por partículas grandes y $g=-1$ esparcimiento total hacia atrás.

En los casos en los que el medio no es ópticamente delgado se presenta scattering múltiple, donde en promedio cada fotón experimenta varios procesos de esparcimiento, y se puede visualizar el transporte de fotones como una serie de eventos individuales de esparcimiento [22]. Matemáticamente esto es descrito de dos maneras, teoría analítica o teoría de transporte. La primera es mediante las ecuaciones de Maxwell que tienen en cuenta la naturaleza ondulatoria de la luz y las propiedades microscópicas del medio, lo que la hace muy rigurosa y de alto costo computacional, y la segunda, que es la más empleada, hace uso de la Ecuación de Transporte Radiativo (RTE) que tiene en cuenta la naturaleza corpuscular de la luz [4] es la aproximación más útil para resolver problemas prácticos. Debido a la complejidad para resolver la RTE se han considerado diversos métodos con distinto grado de dificultad y precisión, uno de los más populares en la óptica de tejidos por su simplicidad para la estimación de los parámetros ópticos a partir de mediciones experimentales es el modelo fenomenológico de dos flujos de Kubelka Munk (KMM), que puede ser considerado una primera aproximación a la solución completa de la RTE [23].

4.1.4. Teoría de Transporte Radiativo

La Teoría de Transporte Radiativo trata directamente el transporte de los fotones a través de medios absorbedores y esparcidores sin tener en cuenta las ecuaciones de Maxwell y ha sido usada extensivamente al tratar con interacciones laser-tejido [20]. La Ecuación de Transporte Radiativo (RTE) es la ecuación integro diferencial central de esta teoría, que provee una descripción matemática para el fenómeno físico de transferencia de energía, en la forma de radiación electromagnética, a través de medios turbios [24]. Existen varias versiones de

esta ecuación, aquí utilizaremos la versión en términos de la intensidad de la radiación presentada en la ec. 4.

$$\frac{\partial I(\vec{r}, \hat{s}, t)}{c_0 \partial t} = -\mu_t I(\vec{r}, \hat{s}, t) - \hat{s} \cdot \vec{\nabla} I(\vec{r}, \hat{s}, t) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} I(\vec{r}, \hat{s}', t) p(\hat{s}, \hat{s}') d\Omega' \quad (4)$$

Tenemos que $I(\vec{r}, \hat{s}, t)$ es la intensidad de radiación, relacionada con el campo eléctrico, en el punto $\vec{r}$ en la dirección $\hat{s}$ y se expresa en unidades de potencia por unidad de área por unidad de ángulo sólido ($W/cm^2 sr$); y el medio es representado el coeficiente de atenuación μ_t , el coeficiente de scattering μ_s y la función $p(\hat{s}, \hat{s}')$, que es la función de fase de un fotón que presenta scattering desde un punto $\hat{s}'$ hasta $\hat{s}$, cuando el scattering es simétrico relativo a la dirección de la onda incidente entonces la función de fase solamente depende del ángulo de scattering θ que se definió en la ecuación 3 y se tendría $p(\hat{s}, \hat{s}') = p(\theta)$ [2].

La RTE representa el balance de energía para la propagación de la luz a través de un elemento infinitesimal de volumen que tiene en cuenta su velocidad, posición y cambios debidos a colisiones, su cantidad principal es la radiancia espectral o intensidad espectral específica, el primer término del lado derecho de la igualdad se refiere a la pérdida de intensidad debidas a la absorción y scattering, y el segundo a la intensidad esparcida en el ángulo sólido. A pesar de no representar rigurosamente la física real de los procesos ha llevado a modelos útiles para muchos problemas prácticos [19].

En la propagación de la luz a través de medios turbios y tejidos biológicos las soluciones de la RTE usualmente están dadas por metodos numéricos debido a su complejidad, por lo que se buscan modelos aproximados y acercamientos más simples principalmente dependiendo del valor del albedo, es decir, del proceso dominante. Los métodos utilizados son scattering de primer orden (Ley de Beer-Lambert), teoría de Kubelka Munk, la aproximación de difusión o métodos estadísticos como simulaciones de Monte Carlo, y el método de adición y doblamiento [20]. Cuando el scattering múltiple es dominante ($\mu_s \gg \mu_a$) se emplea la aproximación de difusión para obtener la Ecuación de Difusión (DE).

Todos estos enfoques se utilizan para diferentes condiciones teniendo en cuenta las posibles condiciones iniciales y de frontera; la precisión de cada uno se

relaciona con la complejidad del mismo [3], desde modelos fenomenológicos simples que relacionan la reflectancia y transmitancia con los coeficientes de absorción y scattering hasta los más precisos que resuelven la RTE numéricamente para la reflectancia y transmitancia como una función de los coeficientes de absorción y scattering [23].

4.1.5. Modelo de Kubelka-Munk

Uno de los más populares debido a su simplicidad es el modelo fenomenológico de dos flujos de Kubelka-Munk, que reduce el problema de la interacción de los fotones con el medio teniendo en cuenta solamente dos componentes angulares de la radiancia, es decir, supone que la luz se esparce solamente en la dirección hacia delante y hacia atrás. Además asume que la geometría del medio es una capa de grosor constante finito h , tan larga y ancha que la cantidad de luz perdida en los bordes sea despreciable, y que es homogénea o que sus inhomogeneidades sean mucho más pequeñas que su espesor y se encuentren uniformemente distribuidas [23].

Es un modelo unidimensional de la RTE basado en la teoría de dos flujos, el flujo óptico I_+ , que viaja en la dirección z — positiva se disminuye por los procesos de absorción y scattering que se dan en la interacción con el medio, y aumenta por el backscattering del flujo contrapropagante I_- en la misma dirección. Los cambios por unidad de longitud en el flujo contrapropagante se determinan de manera análoga, y ambos se representan mediante las ecuaciones diferenciales presentadas en la ec. 5 [4].

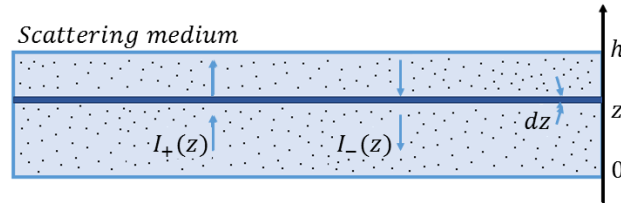


Figura 2: Representación de los dos flujos en el modelo de KM.

Donde K y S , denominados coeficientes de Kubelka-Munk son coeficientes

característicos de cada material, relacionados a la fracción de cada flujo, que se pierde debido a la absorción y el scattering respectivamente; se asume que los coeficientes son uniformes a través del medio [21].

$$\begin{aligned}\frac{dI_+}{dz} &= -(K + S) I_+ + S I_- \\ \frac{dI_-}{dz} &= (K + S) I_- - S I_+\end{aligned}\tag{5}$$

Además, relaciona la razón K/S de los coeficientes efectivos directamente con los valores medidos de transmitancia y reflectancia difusa (T_d y R_d) mediante formulaciones matemáticas simples, asumiendo que el índice de refracción de la capa o lámina es igual al de su ambiente, siguiendo el razonamiento de *Van Gemert et al.* se obtiene la ec. 6 [25]

$$\begin{aligned}\frac{K}{S} &= \frac{(1 - R_d)^2 - T_d^2}{2R_d} = a - 1 \\ a &= \frac{1 + R_d^2 - T_d^2}{2R_d}; b = \sqrt{a^2 - 1}\end{aligned}\tag{6}$$

Finalmente para la estimación de los coeficientes reales de absorción y de scattering se tiene la ec. 7 en combinación con la ec.2, por lo que el protocolo permite una rápida determinación de las propiedades ópticas.

$$\begin{aligned}K &= 2\mu_a \\ S &= \frac{1}{bt} L n \left(\frac{1 - R_d(a - b)}{T_d} \right)\end{aligned}\tag{7}$$

4.1.6. Ecuación de Difusión (DE)

A partir de la intensidad $I(\vec{r}, \hat{s}')$ definida en 4.1.4, se introducen dos cantidades relevantes para describir la difusión de la luz; la primera es la intensidad promedio o tasa de fluencia, que se define como la magnitud del flujo de

energía por unidad de área por unidad de tiempo $\phi(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} I(\vec{r}, \hat{s}, t) d\Omega$, y la segunda es la densidad de flujo total o corriente de fotones, que además nos da información direccional sobre la propagación del flujo de energía $\vec{J}(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} I(\vec{r}, \hat{s}, t) \hat{s} d\Omega$. Luego integrando la ec. 4 sobre el ángulo sólido (4π) se llega a la siguiente ecuación de continuidad de conservación de energía que las relaciona.

$$\frac{\partial \phi(\vec{r}, t)}{c_0 \partial t} + \mu_a \phi(\vec{r}, t) + \vec{\nabla} \cdot \vec{J}(\vec{r}, t) = S_0(\vec{r}) \quad (8)$$

Nótese que en la ec. 8 se añadió el término S_0 , que da cuenta de la existencia de fuentes de radiación en lugar de asumir que la fuente incidente se ubica en el infinito [26]. Cuando un haz colimado interacciona con un medio turbio ($\mu'_s > \mu_a$), los fotones pierden su direccionalidad inicial debido al scattering múltiple y su movimiento puede describirse como un proceso difuso [13], en esta subsección se compilarán los cálculos que han sido desarrollados en detalle en la tesis de doctorado de David Boas (1996) [27] para llegar a la DE.

Para simplificar la RTE en este caso se utiliza la aproximación P_N , que consiste en representar la intensidad de la radiación como una expansión en series de armónicos esféricos asociados con los polinomios de Legendre. Además, asumiendo que la fuente es casi isotrópica esta serie se puede truncar y la aproximación P_1 sería suficiente, quedando expresada como se presenta en la ec. 9 [16].

$$I(\vec{r}, \hat{s}, t) = \frac{1}{4\pi} \phi(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \vec{J}(\vec{r}, t) \quad (9)$$

Posteriormente, reemplazando esta expresión en la RTE con fuentes, multiplicando todo por $\hat{s}$ e integrando sobre el ángulo sólido se obtiene la siguiente expresión, donde $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$.

$$\frac{\partial \vec{J}(\vec{r}, t)}{c_0 \partial t} + (\mu'_s + \mu_a) \vec{J}(\vec{r}, t) + \frac{1}{3} \vec{\nabla} \phi(\vec{r}, t) = \vec{S}_1(\vec{r}) \quad (10)$$

El término del momento dipolar asociado a la fuente ($\vec{S}_1(\vec{r})$) se desprecia ya que la dirección de propagación es aleatoria, por la suposición de fuente isotrópica. Además, si se asume que las variaciones temporales en la corriente de fotones $\vec{J}(\vec{r}, t)$ son lentas (para una fuente constante la tasa a la que la energía atraviesa una unidad de área es constante)[26], el primer término también se ignora, simplificando la ecuación a la ley de difusión de Fick.

$$\vec{\nabla} \phi(\vec{r}, t) = 3(\mu'_s + \mu_a) \vec{J}(\vec{r}, t) \quad (11)$$

Finalmente, reemplazando la ec. 11 en la ec. 8 se obtiene la ecuación de difusión para la intensidad promedio, donde $D = \frac{c_0}{3(\mu'_s + \mu_a)}$ es el coeficiente de difusión de los fotones.

$$\vec{\nabla} \cdot (D \vec{\nabla} \phi(\vec{r}, t)) - c_0 \mu_a \phi(\vec{r}, t) - \frac{\partial \phi(\vec{r}, t)}{\partial t} = -c_0 S_0(\vec{r}, t) \quad (12)$$

En el dominio de frecuencias la ec. 12 puede reescribirse como la ecuación de Helmholtz, donde el número de onda es $k_{ac}^2 = \frac{-c_0 \mu_a + i\omega}{D}$ y cuya solución está relacionada con las funciones de Green.

$$(\vec{\nabla}^2 + k_{ac}^2) \phi_{ac}(\vec{r}) = -\frac{c_0}{D} S_0(\vec{r}) \quad (13)$$

4.1.7. Ecuación de Correlación de Difusión (CDE)

Cuando se hace incidir luz coherente en una superficie irregular se presentan patrones de interferencia de los frentes de onda llamados *speckles*, si el medio tiene dispersores en movimiento este se denomina *speckle* dinámico. Generalmente los tejidos biológicos contienen scatterers estáticos o de poco movimiento como organelos, mitocondria, entre otros, y scatterers en movimiento como glóbulos rojos, que ocasionan que la intensidad de la radiación en el detector fluctue con el tiempo [28]. Para describir la correlación entre la señal en un tiempo t y un tiempo $t + \tau$ se tiene la función de autocorrelación temporal de la intensidad $G_2(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle$, la cual se relaciona con las mediciones, sin embargo, para una descripción completa de las fluctuaciones se debe calcular la función de autocorrelación temporal asociada al campo eléctrico $G_1(\tau) = \langle \vec{E}(t) \cdot \vec{E}^*(t + \tau) \rangle$ a través de la relación de Siegert presentada en la ec. 14, donde β tiene en cuenta el número de *speckles* detectados y la coherencia de la fuente [13].

$$G_2(\tau) = \langle I \rangle^2 + \beta |G_1(\tau)|^2 \quad (14)$$

Ackerson *et al.* sugieren que la función $G_1^T(\vec{r}, \hat{s}, t)$ obedece la ecuación de transporte de correlación (CTE) presentada en la ec. 15, análoga a la RTE [29, 30]; con la única diferencia de que la ec. 15 acumula el decaimiento de cada evento de scattering, por lo que se añade la función normalizada de autocorrelación temporal de scattering simple ($g_1^T(\hat{s}, \hat{s}', \tau)$) al término que tiene

en cuenta el scattering en la RTE [27].

$$\vec{\nabla} \cdot G_1^T(\vec{r}, \hat{s}, \tau) \hat{s} + \mu_t G_1^T(\vec{r}, \hat{s}, \tau) = \mu_s \int G_1^T(\vec{r}, \hat{s}', \tau) g_1^s(\hat{s}, \hat{s}', \tau) p(\hat{s}, \hat{s}') d\Omega' + S(\vec{r}, \hat{s}) \quad (15)$$

Siguiendo pasos de formalismo idénticos a los resumidos en 4.1.6 de la aproximación de difusión, se deriva la ecuación de difusión de correlación (CDE) para la tasa de fluencia de correlación $G_1(\vec{r}, \tau) = \int_{4\pi} G_1^T(\vec{r}, \hat{s}, \tau) d\Omega$ presentada en la ec. 16, donde $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ es el número de onda y $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ es el desplazamiento cuadrático medio de las partículas durante el tiempo τ , en la tabla 1 se presentan distintas expresiones para este término dependiendo del modelo de flujo considerado. En la práctica comúnmente se utiliza el modelo de difusión *browniana* (BDM) que asume movimiento incoherente ocasionado por las múltiples interacciones de los esparcidores [31].

$$\left[\vec{\nabla} \cdot (D \vec{\nabla}) - c_0 \mu_a - \frac{1}{3} \alpha \mu'_s c_0 k_0^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle \right] G_1(\vec{r}, \tau) = -c_0 S_0(\vec{r}) \quad (16)$$

Modelo de flujo	$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$
Difusión Browniana (BDM)	$6D_b \tau$
Flujo Aleatorio (RFM)	$V_{RBC}^2 \tau^2$
Suma (BDM+RFM)	$6D_b + V_{RBC}^2 \tau$

Tabla 1: Desplazamiento cuadrático medio para distintos modelos de flujo.

Recordando que la ec. 16 tiene la misma forma que la DE (ec. 12), las soluciones de la CDE tendrán entonces la misma forma de funciones de Green, y dependiendo de las distintas condiciones de frontera, descritas con detalle en el artículo *review* de 2010 de Durduran *et al.*[16], se llega a las funciones presentadas en la tabla 2, donde $K(\tau) = \sqrt{(\mu_a + \alpha \mu'_s k_0) \langle \Delta r^2(\tau) \rangle / 3} c_0 / D$ es el término que lleva la información dinámica.

Geometría	Solución
Medio infinito	$G_1(\vec{r}, \vec{r}_s) = \frac{c_0}{4\pi D \vec{r} - \vec{r}_s } e^{-k \vec{r} - \vec{r}_s }$
Medio Semi-infinito	$G_1(\rho, z, \tau) = \frac{c_0}{4\pi D} \left[\frac{e^{-K(\tau)r_1}}{r_1} - \frac{e^{-K(\tau)r_b}}{r_b} \right]$
Lámina infinita	$G_1(\rho, z, \tau) = \frac{c_0}{4\pi D} \sum_{m=-\infty}^{\infty} \left[\frac{e^{-K(\tau)r_{+,m}}}{r_{+,m}} - \frac{e^{-K(\tau)r_{-,m}}}{r_{-,m}} \right]$

Tabla 2: Funciones de Green solución a la CDE para diferentes condiciones de frontera.

Con excepción del caso de medio infinito el problema se resuelve utilizando coordenadas cilíndricas, y las geometrías consideradas típicamente en el caso de tejidos son las de medio homogéneo semi-infinito o lámina infinita homogénea, siendo la primera un caso particular de la segunda, para el cual solo se consideran los términos $m = 0$, con solo una frontera planar. La notación utilizada en expresión se presenta en la tabla 3 en el Anexo A.

4.2. Marco Experimental

4.2.1. “Phantoms” de tejido biológico blando

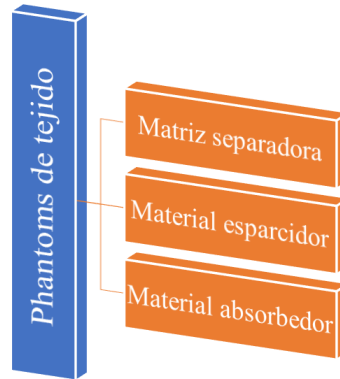


Figura 3: Composición básica de un *phantom*.

Los *phantoms*, son modelos físicos que simulan las propiedades ópticas de los tejidos blandos, para poner a prueba diseños de sistemas de diagnóstico o imagenología médica, comparar el rendimiento entre ellos, optimizar las señales y realizar control de calidad [32]. Los *phantoms* líquidos son ampliamente utilizados porque pueden ser fácilmente replicados y su composición básica consiste en un medio esparcidor, un medio absorbedor y un medio diluyente o matriz separadora.

Una elección común para el material esparcidor es Intralipid® [33], que es una emulsión de grasas utilizada en el ámbito clínico para la nutrición intravenosa de pacientes, al ser biológicamente similar a la bicapa lipídica de células y organelos que ocasionan scattering en los tejidos, y también porque cumple con estándares clínicos presentando uniformidad entre lotes. Otros materiales usados con menos frecuencia son microesferas poliméricas y polvos de óxido de titanio o aluminio.

La elección para absorbedores varía desde sangre y células, ya que los cromóforos en los tejidos consisten básicamente en agua y hemoglobina, hasta tinta y tintes moleculares, como opciones menos biológicas pero más estables. Los diluyentes son típicamente agua, gelatina, silicona, alcohol de polivinilo, entre otros [7].

Los componentes de los *phantoms* de espectroscopía óptica, imagenología y terapia se definen de acuerdo al tipo de tejido que se busca simular y a la técnica que se va a emplear, a lo largo de las últimas décadas se han propuesto muchos modelos útiles. Para evaluar distintas técnicas en óptica difusa o ultrasonido Doppler se requieren *phantoms* que además fluyan, para lo cual se utilizan mangueras o tubos pequeños que simulen los vasos sanguíneos y bombas o jeringas, de manera que se pueda tener control sobre la velocidad de flujo.

4.2.2. Espectroscopía UV-VIS

En la técnica de espectroscopía UV-VIS se utiliza la absorción de la luz como una herramienta analítica para identificar y cuantificar distintas sustancias. Un montaje experimental típico para realizar este tipo de mediciones se muestra en la fig.4. Radiación electromagnética en el rango visible (aprox. 400 : 800 nm)

y/o ultravioleta (aprox. 200 : 400 nm) del espectro viaja hacia la muestra a través de una fibra óptica, y dependiendo de la sustancia se dan los procesos de propagación descritos en la fig. 1 a mayor o menor grado. La luz transmitida se recolecta con otra fibra óptica, para medir su intensidad en función de la longitud de onda utilizando un espectrómetro, instrumento que permite obtener el espectro característico de la muestra y compara su intensidad con la intensidad inicial de la luz antes de pasar a través de la sustancia [34].

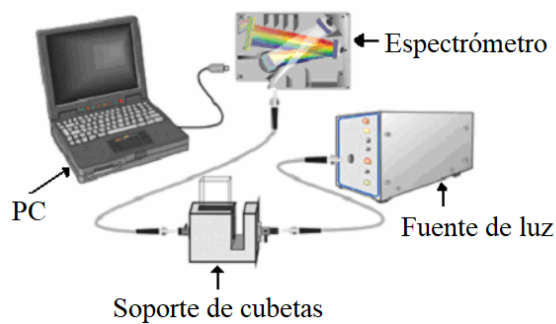


Figura 4: Montaje típico para medir absorbancia/transmitancia [35].

Instrumentación requerida para Espectroscopía UV-VIS:

- Una fuente de luz que debe ser continua a lo largo del rango de longitudes de onda de interés. Las lámparas halógenas de tungsteno cubren el rango VIS, y para llegar a longitudes de onda en el UV se requiere una fuente adicional, que comúnmente es una lámpara de descarga de deuterio [36].
- Un monocromador que selecciona una longitud de onda particular, o más bien, una banda estrecha de longitudes de onda, lo que define la resolución espectral del espectrómetro. Para separar las diferentes longitudes de onda de la radiación a distintos ángulos comúnmente se utiliza un prisma o una rejilla de difracción [34]. La mayoría de los instrumentos actuales utilizan rejillas, ya que permiten obtener alta resolución espectral.
- Un detector que convierte la señal óptica en una señal eléctrica. Puede ser un fotomultiplicador de efecto cascada, un arreglo multicanales (de fotodiodos) o un dispositivo de carga acoplada (CCD) [34].

En la fig.5 se muestra la representación esquemática de un espectrómetro con monocromador de rejilla. En el componente (1) está el puerto de entrada, en el cual se asegura el extremo de la fibra óptica utilizada para recolectar la luz, el (2) es el espejo colimador, encargado de coleccionar la luz que entra en el banco óptico e iluminar la rejilla (3) del espectrómetro, y el (4) es el espejo de enfoque, que recibe la luz refractada por la rejilla y la enfoca hacia el detector (5).

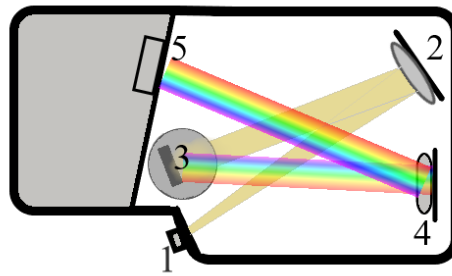


Figura 5: Representación esquemática de un espectrómetro UV-VIS.

4.2.3. Espectroscopía NIR: Espectroscopía de Correlación Difusa

La espectroscopía infrarroja trata el espectro de mayor longitud de onda y menor frecuencia que la luz visible, que va desde aproximadamente los 760 nm hasta 1 mm y se divide en infrarrojo cercano o NIR (hasta los 2500 nm), medio (hasta 50000 nm), y lejano (hasta 1 mm). Los láseres infrarrojos tienen la ventaja de que la contribución de pérdidas por scattering es mucho menor que en el rango VIS [37]. En los últimos años las tecnologías difusas NIR se han popularizado debido a que son simples, portables, no invasivas y relativamente de bajo costo, siendo útiles para el análisis cuantitativo de distintos compuestos, tanto en la industria alimenticia como en aplicaciones clínicas para la cuantificación de la hemodinámica y el metabolismo en tejidos.

La espectroscopia de correlación se utiliza para el estudio de procesos dinámicos o en movimiento, basándose en la correlación entre el espectro de la salida del fotodetector y la intensidad del espectro de la luz incidente [28]. De esta forma, la Espectroscopía de Correlación Difusa DCS permite detectar el flujo

sanguíneo de manera no invasiva, lo que la ha hecho una técnica importante para monitorear la salud de la microvasculatura en enfermedades que afectan la misma, como lo son la diabetes, cáncer y coagulación frecuente [38].

El montaje estándar de DCS se presenta en la fig. 6, consiste en un láser IR de alta coherencia, de onda continua CW (entre 650 nm y 900 nm) que se incide en una muestra turbia o tejido, como resultado de la propagación de fotones en el tejido la luz coherente va a presentar scattering múltiple ocasionando fluctuaciones de intensidad temporales en los patrones de speckle que son sensibles al movimiento de glóbulos rojos, o de otros esparcidores en movimiento. Estas fluctuaciones se detectan típicamente a unos centímetros de la fuente por un detector de conteo de fotones de alta sensibilidad y un correlacionador de hardware o software que cuantifica la estadística temporal de los speckles tomando la salida de los contadores de fotones y, utilizando un modelo de correlación, calcula sus funciones de autocorrelacion de intensidad. Posteriormente el decaimiento de estas curvas se puede ajustar a la solución de la CDE, con la corrección del movimiento browniano, para estimar la función de autocorrelación del campo eléctrico lo que permite relacionar cuantitativamente las fluctuaciones del campo eléctrico con el movimiento de los glóbulos y así obtener un índice de flujo sanguíneo BFi en unidades de cm^2/s que es proporcional al flujo sanguíneo local [39].

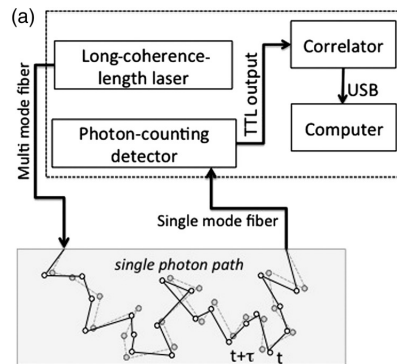


Figura 6: Esquema estándar de un equipo de DCS [39].

4.2.4. Ventana Óptica Biológica (VOB)

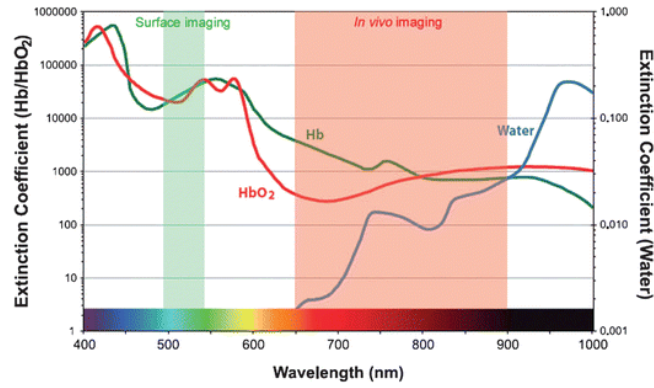


Figura 7: Coeficiente de extinción vs. longitud de onda para oxihemoglobina, desoxihemoglobina y agua [40].

Se define como ventana óptica, terapéutica o diagnóstica a la región del espectro electromagnético más óptima para visualizar un tejido biológico, donde la radiación pueda penetrar hasta varios centímetros. En la fig. 7 se presenta, en una gráfica logarítmica, el coeficiente de extinción para componentes de un tejido biológico, en específico de la oxihemoglobina, desoxihemoglobina y agua; se observa la dependencia espectral de la absorción. El rango de baja absorción, para la hemoglobina esto es desde aprox. 650 nm y antes de 900 nm para el agua. Por esta razón es que la zona de longitudes de ondas del rojo y el infrarrojo cercano permite el desarrollo de técnicas de imagenología.

4.3. Estado del arte

La biofotónica es un campo multidisciplinario que integra la medicina, biología, química, física e ingeniería y ofrece muchas oportunidades para el desarrollo de técnicas de diagnóstico para el reconocimiento temprano de enfermedades y terapias dirigidas con luz, permitiendo así explorar estructuras y funciones celulares, y manipular tejidos y estructuras celulares de manera no invasiva [1]. Debido a la creciente necesidad alrededor del mundo de imagenología médica no invasiva que permita una examinación rápida, y que no requiera ninguna

preparación del objeto examinado se han desarrollado distintas tecnologías ópticas teniendo en cuenta las propiedades ópticas de los tejidos.

4.3.1. Métodos ópticos de imagenología médica

Entre las más comunes se encuentran las modalidades de tomografía OCT, ampliamente utilizada para detectar y monitorear distintas enfermedades oculares, que fue inventada a mediados de los 90s por Huang *et al.* en el laboratorio de James Fujimoto en el Massachusetts Institute of Technology (USA) [41] y DOT, que ha estado en crecimiento desde la misma época. También se tienen otras más novedosas dentro de las técnicas pertenecientes a LSCI, donde el uso de una cámara para obtener una instantánea del patrón de speckle fue propuesto desde 1980 por el grupo liderado por A.F. Fercher en la Universidad de Essen (Alemania) [42], se han desarrollado SCOT y SCOS, que con el avance de las técnicas digitales lograron una versión en tiempo real del método.

Más recientemente, en el año 2019, se ha presentado un sistema portátil de HD-DOT (High-Density Diffuse Optical Tomography) para aplicaciones pediátricas. Este sistema, desarrollado por el Grupo de J. Culver de la Universidad de Washington, fue ensayado exitosamente en la clínica Imbanaco de la ciudad de Cali con el fin de mapear de manera dinámica la función cerebral de niños pequeños, y estudiar los efectos de la nutrición en la misma [43].

Una tecnología que se basa en el patrón de speckle es DCS, desarrollada a partir de la teoría de scattering de luz dinámico (DLS) y que tiene las mismas ventajas de penetración que DOS/DOT, pero al medir directamente movimiento de glóbulos rojos provee información acerca de factores importantes como es el caso del flujo sanguíneo cerebral. Ha sido validada en tejidos comparandola con otras técnicas empleadas en el ámbito clínico como ultrasonido Doppler, CT, ASL-MRI, entre otras [16]. Las limitaciones de DCS son la contaminación introducida por tejido extracerebral y la necesidad de conocer las propiedades ópticas del tejido para cuantificar correctamente el BFi, ya que las incertidumbres en los coeficientes de absorción y scattering llevan a errores sustanciales en CBFi.

Recientemente, gracias a los avances en la tecnología DCS, se pueden realizar mediciones con frecuencias de adquisición superiores a 25Hz : fastDCS, que permite resolver el comportamiento pulsátil del flujo sanguíneo debido a las fluctuaciones del ciclo cardiaco, previamente consideradas como ruido. Esto es relevante ya que abre oportunidades para nuevas aplicaciones de DCS, donde la variabilidad del flujo sanguíneo permita derivar nuevos biomarcadores potenciales, como lo son la presión crítica de cierre (CrCP) presentado por Baker *et al.* en 2017 [44], parámetros relacionados a la autoregulación como en el estudio de 2018 de Parthasarathy *et al.* [45] y presión intracraneal (ICP) en 2020 por Ruesch *et al.* [46] y Fischer *et al.* [47].

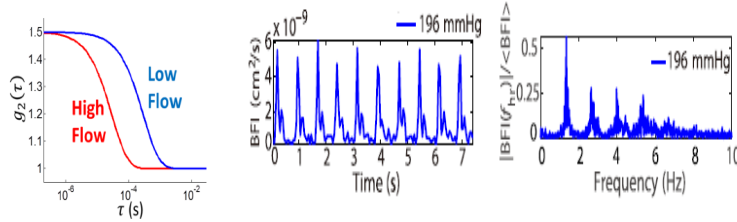


Figura 8: Ejemplo de mediciones de fastDCS [48].

En la fig. 8 se muestran ejemplos de curvas de correlación tomados de artículos de Wang *et al.* de 2016 y 2019, para flujo rápido y flujo lento, presentando una curvatura mayor en el decaimiento para el máximo flujo sistólico comparando con el mínimo diastólico, además se muestra el índice de flujo sanguíneo con su correspondiente transformada de Fourier FFT.

4.3.2. Sobre los modelos físicos de los tejidos

Las propiedades ópticas de los tejidos han sido tabuladas por distintos autores, y sus resultados se encuentran resumidos en un review de Steven L. Jacques de 2013, donde se presenta la dependencia con la longitud de onda de la absorción y del esparsamiento de un tejido genérico con cantidades variables de cromóforos [49]. El desarrollo de todos los sistemas de imagenología médica requiere de *phantoms* apropiados cuyas propiedades de absorción y de esparsamiento

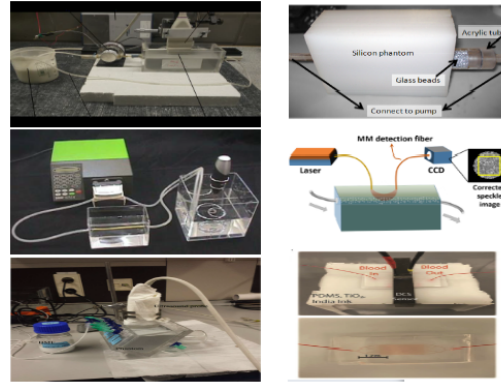
simulen las de los tejidos humanos, y se han propuesto distintos materiales para prepararlos durante los últimos 30 años logrando crear varios modelos útiles, de los cuales hay amplia literatura al respecto [50]. Los primeros estudios se enfocaban en crear objetos que reprodujeran los coeficientes a longitudes de onda específicas, sin embargo, en las últimas dos décadas se ha buscado proveer *phantoms* que reproduzcan las características de los tejidos en rangos amplios de longitudes de onda para ajustarse al espectro completo. David W. Pogue y Michael Patterson en 2006 publicaron un artículo donde se habla de la escogencia de los componentes, el propósito de los phantoms y criterios para determinar su valor [7].

Dentro de los *phantoms* líquidos más populares se encuentran los basados en emulsiones lipídicas, como lo son Intralipid[®] propuesto por Di Ninni *et al.* en 2011 [33] y que ha sido caracterizado por diferentes autores como Ben Aernouts *et al.* en 2013 [51, 52]; el grupo de Di Ninni asimismo estudió distintas emulsiones como Lipovenoes[®] y Lipofundin[®] en 2012 [53], la preparación y caracterización de *phantoms* usando la última fue realizada por L. Cortese *et al.* en el 2018. Además, utilizando tinta china como medio absorbedor por L. Spinelli *et al.* en el 2014, W. Bachir y A. Shahin en 2017.

También se tienen *phantoms* de flujo o pulsátiles, en la fig. 9 se muestran algunos modelos usados para aplicaciones de ultrasonido Doppler y óptica difusa. La primera se utiliza para medir velocidad de flujo, así que la construcción de *phantoms* que simulen las características de flujo dentro de los vasos sanguíneos es común, se muestran los desarrollados por Zhou *et al.* en 2017 [54], Coiado *et al.* en 2009 [55] 2009 y Camfferman *et al.* en 2015 [56]. Lo que comparten estos tres modelos es que consisten en mangueras por las que se hace fluir el líquido y distintos tipos de bomba, ya sea bombas de engranajes, peristáltica o de infusión de jeringa, el primero incluso incluye control computarizado de la velocidad para la producción de flujo pulsátil.

En óptica difusa, es decir, la segunda columna; tanto el primer modelo, presentado por Renzhe *et al.* en 2020 [57], como el segundo, por Dong *et al.* en 2012 [58], consideran un tubo o manguera embebida en un *phantom* sólido, mientras que el tercero, por Sathialingam *et al.* tiene una capa de cientos de microcanales bajo una superficie sólida. Cabe resaltar que en este campo no se han desarrollado muchos *phantoms* de flujo pulsátil que sean totalmente

líquidos, sin un componente sólido de propiedades ópticas conocidas.



Ultrasonido Doppler Óptica Difusa

Figura 9: Algunos *phantoms* pulsátiles.

Debido a la complejidad de los tejidos biológicos, en múltiples casos no se tiene una solución analítica exacta de la RTE, por lo que debe ser aproximada o resuelta numéricamente, el enfoque a utilizar se escoge de acuerdo a las condiciones de frontera y a la precisión que se requiera. Comúnmente en combinación con la espectroscopía de reflectancia difusa se utilizan algoritmos de Monte Carlo como los presentados por L. Wang, S. Jacques, y L. Zheng en 1995, y A. Kienle y M. S. Patterson en 1996, se utilizan ampliamente modelos más simples como lo son la teoría de Kubelka Munk, o aproximaciones numéricas basadas en Monte Carlo, como es el IAD (Inverse Adding Doubling) desarrollado por Scott Prahl. Estas aproximaciones permiten determinar los coeficientes de absorción y scattering a partir de las mediciones de reflexión y transmisión de la muestra. Cuando ya se conocen o se tiene una estimación de las propiedades ópticas se puede obtener más información como es el caso de SCOS/SCOT, DCS, que ajustan los datos experimentales a la CDE para estimar el BFi.

5. Metodología y Procedimiento Experimental

5.1. Preparación de los *phantoms*

A lo largo de las últimas décadas se han propuesto distintos modelos con diferentes materiales de composición. Los *phantoms* líquidos son ampliamente utilizados ya que pueden ser replicados fácilmente. En este trabajo, para las mediciones de espectroscopía VIS, se utilizaron materiales de bajo costo y de fácil acceso: agua desmineralizada como medio diluyente, leche con diferentes contenidos de grasa (g/mL) como medio esparcidor, y como medio absorbedor tinta china roja. Se preparan *phantoms* con distintas concentraciones de absorbedor y esparcidor con el fin de variar las propiedades ópticas para modelar tejido biológico blando.

Se empleó leche entera 3 % grasa, leche deslactosada 1.75 % grasa y leche deslactosada 0 % grasa. Las muestras se prepararon en un beaker de 250 mL, diluyendo la leche en agua desmineralizada con el fin de obtener concentraciones de lípido variando desde 0.1 % hasta 1,0 %, con incrementos de 0.05 %, haciendo uso de jeringas desechables de 1 mL, 3 mL y 5 mL. Para la adición de la tinta se utilizó una micropipeta electrónica de 50 μ L, lo que permitió obtener concentraciones de tinta en un rango desde 0.005 % hasta 0.2 % [59].

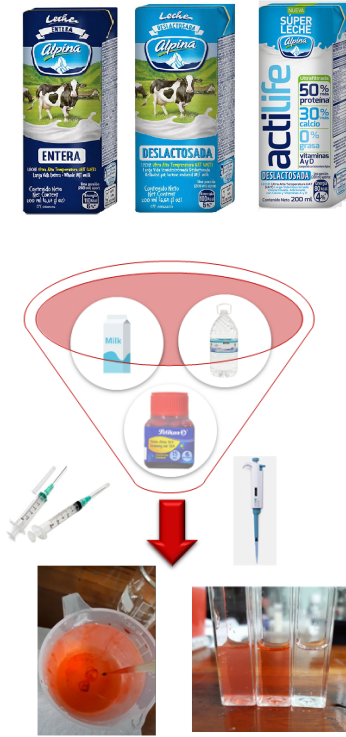


Figura 10: Materiales usados para la preparación de los *phantoms*.

5.2. Montaje experimental

El montaje experimental para la caracterización de los *phantoms* consiste en un sistema de lentes-fibra óptica, donde la luz es analizada y detectada por el espectrómetro HR-2000C+ de Ocean Optics® conectado a un ordenador via USB, que no requiere una fuente de poder o de alimentación externa. Este espectrómetro permite realizar mediciones en un rango de 200-1100 nm, pero en este caso solo nos interesa el rango VIS.

Las muestras se estudian en cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor. Para las mediciones de transmitancia colimada se utiliza una fuente de luz halógena (NI- 30 Fiber Optic Illuminator, Nikon Instruments Inc.), óptica de colimación

y transporte, y soporte de cubetas, como se muestra en la figura 11 . En este caso el detector que recolecta la luz es un arreglo lineal de silicóna CCD, en el cual cada pixel responde a la longitud de onda de la radiación que lo alcanza; creando una respuesta digital a la señal óptica, que posteriormente es transmitida como información al software de operación del dispositivo.

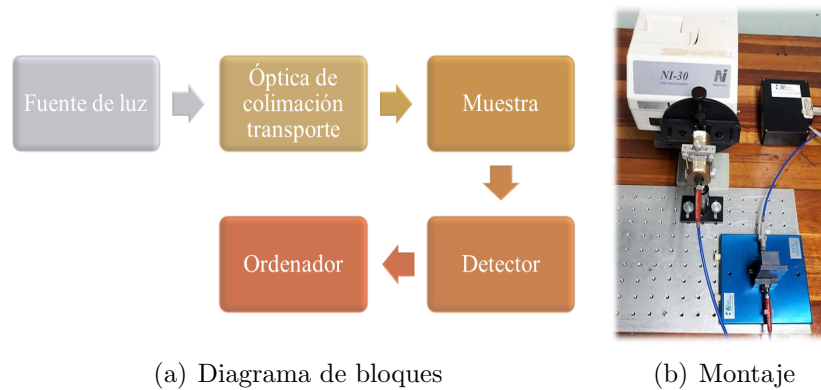


Figura 11: Montaje experimental transmitancia colimada.

Para las mediciones difusas se utiliza un par de esferas integradoras de Thorlabs® como se muestra en la figura 12, estas esferas están fabricadas de un material basado en PTFE (politetrafluoroetileno) llamado espectralón, que presenta un comportamiento altamente Lambertiano (con una reflectividad de hasta 98 % en el rango VIS). La cubeta con la muestra se ajusta en medio de las dos esferas, cuando se mide en la esfera 1, en la puerta a 90° con respecto a la dirección del haz incidente, se obtiene la transmitancia difusa al recolectar la luz después de que ha pasado a través de la muestra, y cuando se mide en la esfera 2 se obtiene reflectancia difusa al recolectar la luz que ha sido reflejada por la muestra.

En el caso de la observación de efectos de fluorescencia se utiliza el kit de LEDs de Ocean Optics® de diferentes longitudes de onda (380 nm, 395 nm, 450 nm, 518 nm, 590 nm , 640 nm y blanco) y láseres portátiles de 405 nm and 532 nm midiendo los espectros con el montaje representado en la Figura 13.

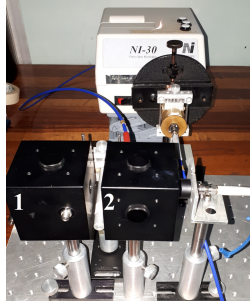


Figura 12: Montaje experimental mediciones difusas.

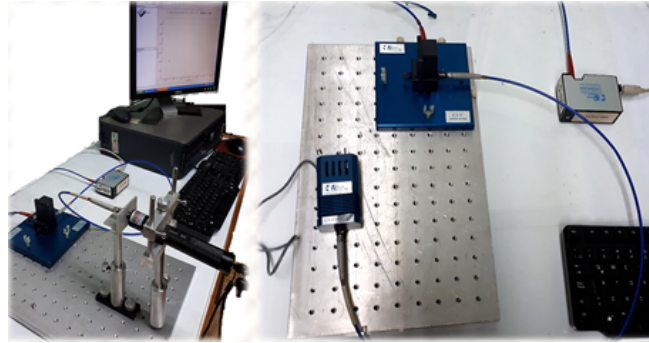


Figura 13: Montaje experimental mediciones de fluorescencia.

5.3. Caracterización de los *phantoms*

Posterior a verificar las conexiones del montaje experimental, los pasos a seguir para realizar la medición de caracterización de los *phantoms* se resumen en el diagrama de flujo de la fig. 15. Con el fin de determinar las propiedades ópticas de los *phantoms* se miden espectros de transmitancia colimada (T_c %) a distintas concentraciones, y mediciones de reflectancia (R_d %) y transmitancia difusa (T_d %), en un rango de longitudes de onda de aproximadamente 400 *nm* hasta 800 *nm*. Además, se pueden observar efectos de fluorescencia con los LEDs verde y violeta, así como con láseres de longitud de onda 405 *nm* y 532 *nm*.

En estas mediciones se debe tener en cuenta el espectro “oscuro” y el “blanco” o de referencia. El primero se refiere al ruido generado por fuentes externas en el ambiente, y se toma cuando la fuente está apagada, es decir, que no llegue luz directa al detector. Si estuviese encendida es preferible bloquear el camino en lugar de apagarla, en caso de hacerlo al volverla a encender se debe esperar unos minutos a que la lámpara se estabilice antes de medir el espectro de referencia. El segundo consiste en la cantidad máxima de luz que llegaría al detector; en el caso de transmitancia esto sería cuando la concentración de lípido sea cero, es decir, se mide la luz que es transmitida a través de la cubeta solamente con agua desmineralizada, y en el caso de reflectancia difusa se cubre el orificio de la esfera con un disco de espectralón, que presenta una absorbancia casi nula.

Los espectros se midieron en el rango VIS utilizando el software SpectraSuite®, que compara la muestra con la medición de referencia y presenta información espectral procesada permitiendo extraer directamente los datos de los espectros (intensidad) y de transmitancia (porcentaje) en formato de documento de texto (.txt). En la fig. 14 se presenta la interfaz del software, los pasos 2. y 3. de la fig.15 tienen que ver con los íconos de espectro de referencia, y el paso 5. con los de extracción de datos.



Figura 14: Barra de herramientas de SpectraSuite®.

Se tomaron tres registros de datos para cada concentración con el fin de reducir error experimental, y el espectro de referencia se verificaba antes de cada medición. Las variables de muestreo utilizadas (paso 1.) fueron tiempo de integración $1000000 \mu s$, es decir $1 s$, número de escaneos para promediar 1 promedio, smoothing 0. Si se cambiasen algunas variables de medición en el software o alguna configuración en el montaje se debe guardar un nuevo espectro oscuro y de referencia.

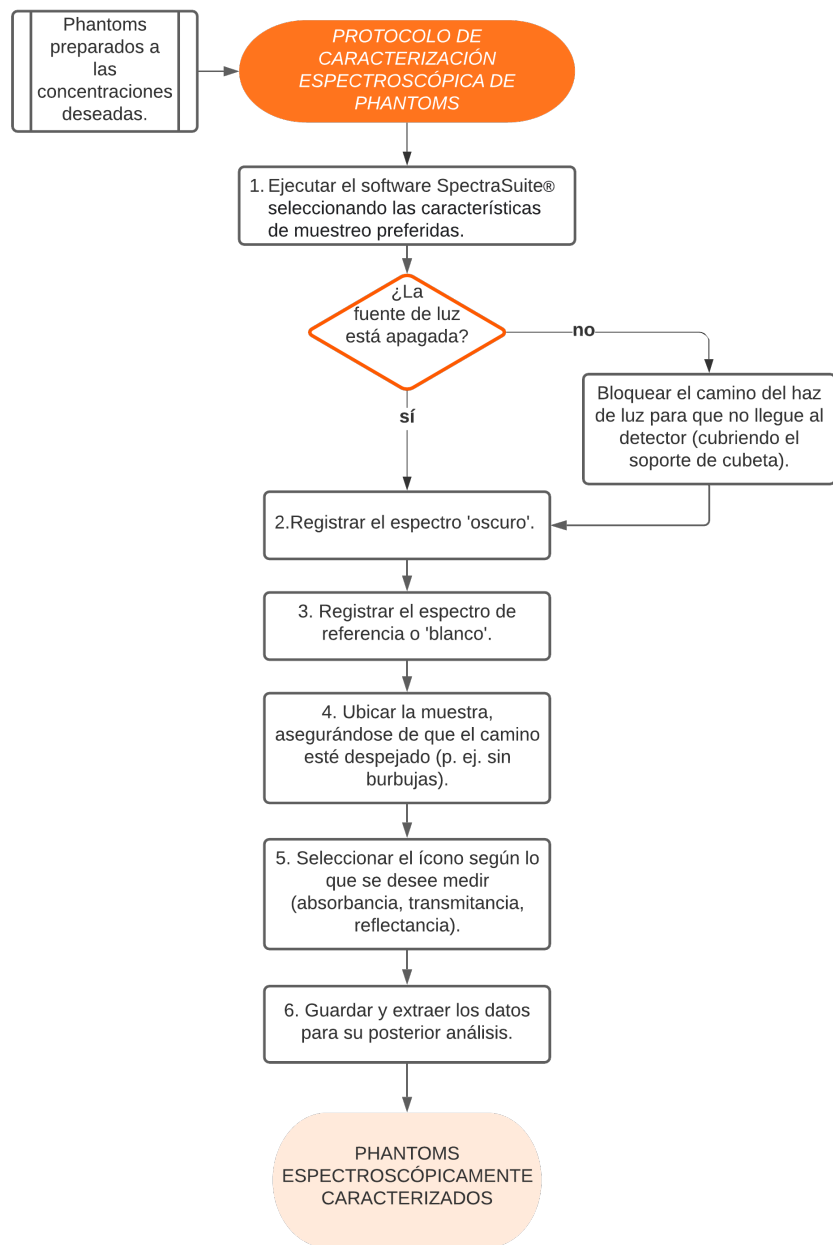


Figura 15: Protocolo de caracterización de los *phantoms*.

5.4. Obtención de las propiedades ópticas de los *phantoms*

En este trabajo se utilizó un método indirecto basado en las expresiones teóricas del modelo de dos flujos de Kubelka Munk a partir de las mediciones de T_c %, R_d %, y T_d % con el método de dos esferas integradoras. El protocolo paso a paso se presenta en el diagrama de flujo de la fig. 17, así como también se explica en la sección de métodos del artículo de IOP de C. Fajardo y E. Solarte (2020) [59]. A partir de los coeficientes efectivos de absorción y de scattering, K y S respectivamente, usando las ecs.6, 7 se puede estimar el coeficiente de absorción μ_a , y combinando los resultados con la ec.1 se obtiene el valor experimental del coeficiente de scattering μ_s . El análisis cuantitativo de los datos crudos y las gráficas finales se realizaron en el software ORIGINPRO®, cuya interfaz se muestra en la fig. 16, para el paso 1. del protocolo el ‘*smoothing*’ de los datos, que se llevó a cabo con el fin de reducir posibles efectos del ruido que luego se verían maximizados en los cálculos; tanto Savitzky-Golay como *Adjacent Averaging* son buenas opciones para eliminar el ruido de fondo, en este caso se utilizó la segunda promediando cada 5 puntos.

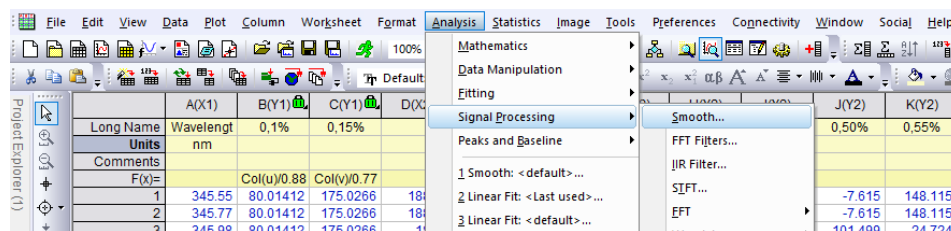


Figura 16: Barra de herramientas del software ORIGINPRO®.

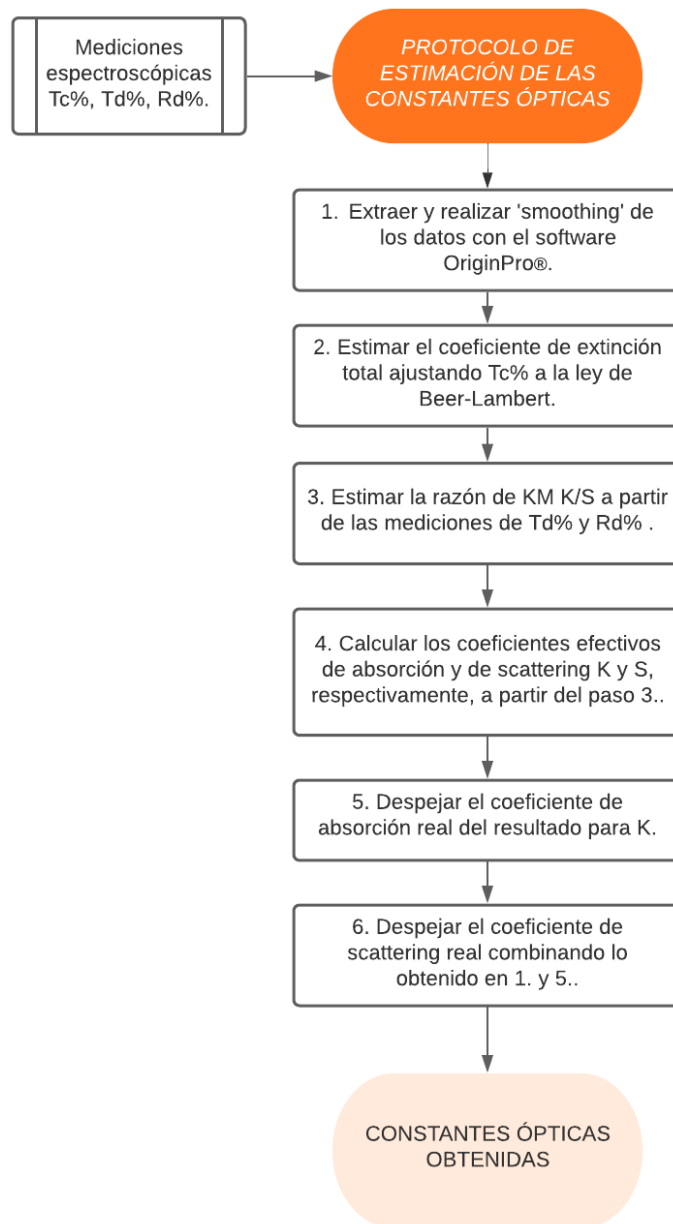


Figura 17: Protocolo de estimación de las constantes ópticas.

5.5. *Phantom* pulsátil

5.5.1. Preparación del *phantom*

Para las mediciones con espectroscopía NIR DCS, se preparó un *phantom* líquido compuesto por agua y la emulsión lipídica Lipofundin® 20 % (B. Braun Melsungen AG, DE), que permite realizar mediciones altamente reproducibles, ya que cumple con estándares clínicos y presenta uniformidad entre lotes. La caracterización óptica de estos *phantoms* fue realizada previamente utilizando espectroscopía resuelta en el tiempo (TRS) y DCS en un estudio conjunto del Politécnico de Milano (POLIMI) y el Instituto de Ciencias Fotónicas (ICFO), descrito con detalle en el artículo de BOEx.2018 de Lorenzo Cortese *et al.* [17].

En este caso no se añadió material absorbedor, por lo que el coeficiente de absorción equivale solamente al agua $\mu_a = 0,0257 \text{ cm}^{-1}$, y se desea preparar un modelo con coeficiente de scattering $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$, por lo que se derivó la receta con el siguiente razonamiento, donde $k = \frac{V_{lipido}}{V_{tot}}$, y las constantes ϵ_s , C , se extraen de la tabla 1. del artículo, para una longitud de onda de 785 nm .

$$\begin{aligned} k &= \frac{(\mu'_s - C)}{0,2 \epsilon_s} \\ V_{lipido} &= \frac{k V_{H2O}}{(1 - k)} \end{aligned} \tag{17}$$

La cantidad de intralípido que debe diluirse en 2000 mL de agua son $132,17 \text{ mL}$, lo que equivaldría a una concentración de $6,6 \% \frac{Vol}{Vol}$. El índice de refracción es $n = 1,33$.

5.5.2. Montaje experimental

Para la construcción del *phantom* pulsátil se requiere de

- *Phantom* líquido basado en lípidos.

- Bomba peristáltica.
- Mangueras de silicona.

El montaje utilizado se muestra en la fig. 19, la bomba empleada es Watson-Marlow 520U, que permite ajustar la velocidad de flujo (revoluciones por minuto) y las mangueras son de 9,6 *mm* de diámetro. Se realizan mediciones con el equipo de fastDCS (Espectroscopía de Correlación Difusa Rápida) del grupo de óptica médica en ICFO, consiste en 2 correlacionadores de hardware con 4 canales de detección cada uno, para un total de 8 canales. La sonda de medición consiste en un rectángulo de espuma con dos orificios con una SDS de 1 *cm*, se utiliza una sola fuente de longitud de onda 785 *nm* y una fibra óptica de detección conectada a los 8 canales del equipo. El líquido basado en lípidos se hace fluir a través de las mangueras y un tubo de PVC de aproximadamente 3,5 *cm* de diámetro con una ventana de mylar, que permite ubicar la sonda. El equipo y la sonda de medición se muestran en la fig. 18.

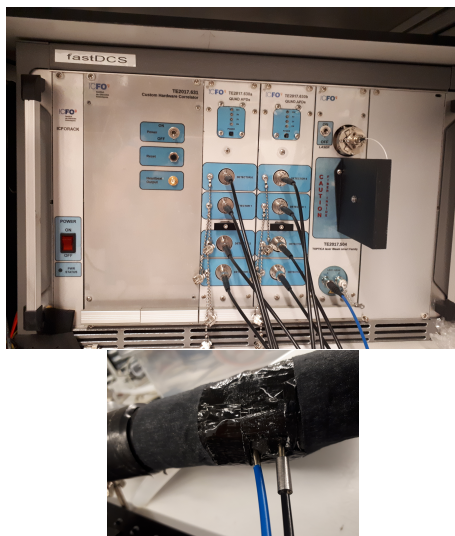


Figura 18: Equipo de fastDCS (ICFO) y sonda de medición.

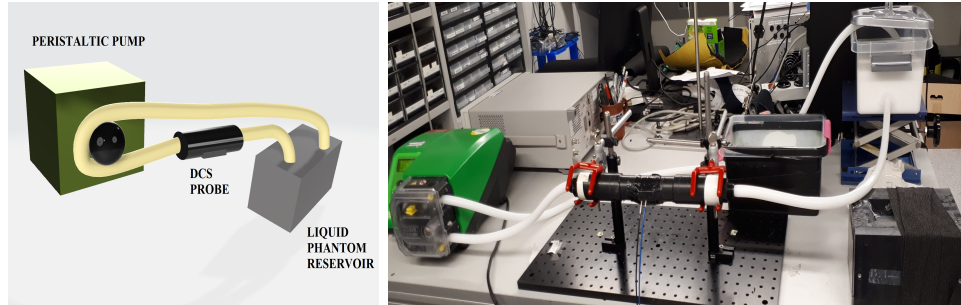


Figura 19: Montaje experimental *phantom* pulsátil.

5.5.3. Caracterización del *phantom*

Primero se calibró la bomba manualmente para saber cuántos mL de fluido se entregan por cada revolución, para bajas velocidades (como $2\ rpm$, $5\ rpm$) se hizo fluir líquido de un contenedor a otro durante cierto tiempo (tal que pasaran al menos 10 revoluciones) y se midió la cantidad de líquido entregado. Esto se realizó primero utilizando agua y luego con el *phantom*. Luego, utilizando la función *Memodose* de la bomba se calibró a una velocidad de $2\ rpm$ durante 5 minutos, y se tomó nota del valor de calibración mostrado en pantalla para compararlo con el nuestro.

Después se caracterizó el comportamiento pulsátil del sistema para saber cuántos pulsos se tienen por cada revolución, para esto se realizaron mediciones de DCS en el tubo para diferentes velocidades, en las configuraciones del software de medición se utilizó un intervalo tiempo de promedio y tiempo de actualización $0,026s$ ($40Hz$), y 1000 puntos de datos por archivo. Se extrajo la transformada de Fourier (FFT) de los datos mediante la función *pwelch* de MATLAB® después de ajustarlos como se describe en 5.5.4, y se graficó la posición del primer pico (Hz) vs. la velocidad de la bomba (en *revoluciones/segundo*), y se ajustaron los datos a un modelo lineal, obteniendo una pendiente en *pulsos/rev*.

También se tomaron mediciones de DCS directamente en un contenedor de *phantom* sin flujo para comparar la función de autocorrelación con la medida en la ventana del tubo utilizado cuando la bomba no estaba corriendo, con el fin de confirmar que el tubo estaba lleno de líquido y que no hubiesen posibles

efectos de *light channeling*.

5.5.4. Obtención del BFi del *phantom* pulsátil

Los datos de DCS inicialmente están en formato ‘.hpdatt’, se extraen y se analizan utilizando el software MATLAB®. Para cada canal se obtiene la función de autocorrelación temporal $g_2(\tau)$, entre otros parámetros, como t y τ , se promedian las funciones de los ocho canales y posteriormente se ajusta a un modelo de los presentados en la tabla 2; se obtiene el “índice de flujo sanguíneo” a partir del término del desplazamiento cuadrático medio (tabla 1). Este ajuste se realizó para la geometría semi-infinita y de lámina infinita, así como también para los tres modelos de flujo BDM, RFM y BDM+RFM, en cada caso para distintas velocidades de flujo de la bomba.

6. Resultados y Análisis

6.1. Caracterización espectroscópica de *phantoms* de bajo costo

En la fig. 20 se muestra el espectro de referencia (blanco) de la lámpara utilizada, resaltando el rango aproximado en el que se van a analizar los datos, también se presenta como disminuye la intensidad medida al aumentar la concentración de leche en el montaje de transmitancia colimada.

Las mediciones de transmitancia colimada (T_c %) del primer experimento para diferentes concentraciones de lípido (desde 0,1 % hasta 1 %) se muestran en la fig. 21, presentando comportamiento similar para los tres tipos de leche, siendo monótonamente creciente con la longitud de onda. Hay, sin embargo, diferencias en la intensidad y la forma del espectro de la leche entera a deslactosada y libre de grasa, siendo la última la que exhibe el mayor porcentaje de transmitancia, como se esperaba (al ser la de menos viscosidad por su composición libre de grasa).

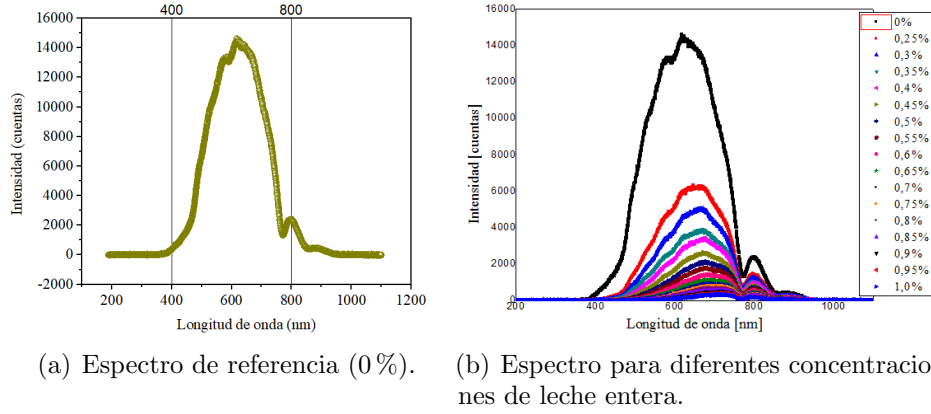


Figura 20: Intensidad vs. longitud de onda (espectroscopia VIS).

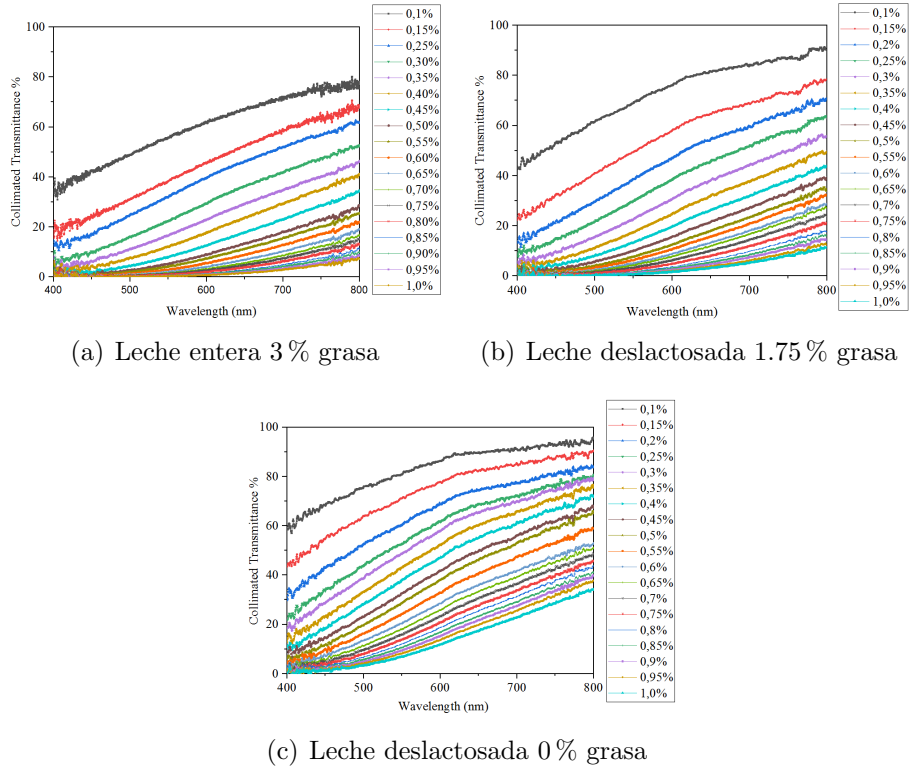


Figura 21: Transmitancia colimada vs longitud de onda para *phantoms* de distintas concentraciones.

El espectro de reflectancia difusa mostrado en la fig. 22 fue medido para cuatro concentraciones de lípido y exhibe un comportamiento monótonamente decreciente, pero también en este caso hay notables diferencias entre los tipos de leche y variaciones con la composición del modelo. Nótese que en este caso se utilizaron concentraciones mucho más altas que para transmitancia colimada, yendo hasta 5,0 %, esto es debido a que entre menos concentración de lípido se presenta menos scattering entonces el porcentaje de reflectancia difusa será mucho menor.

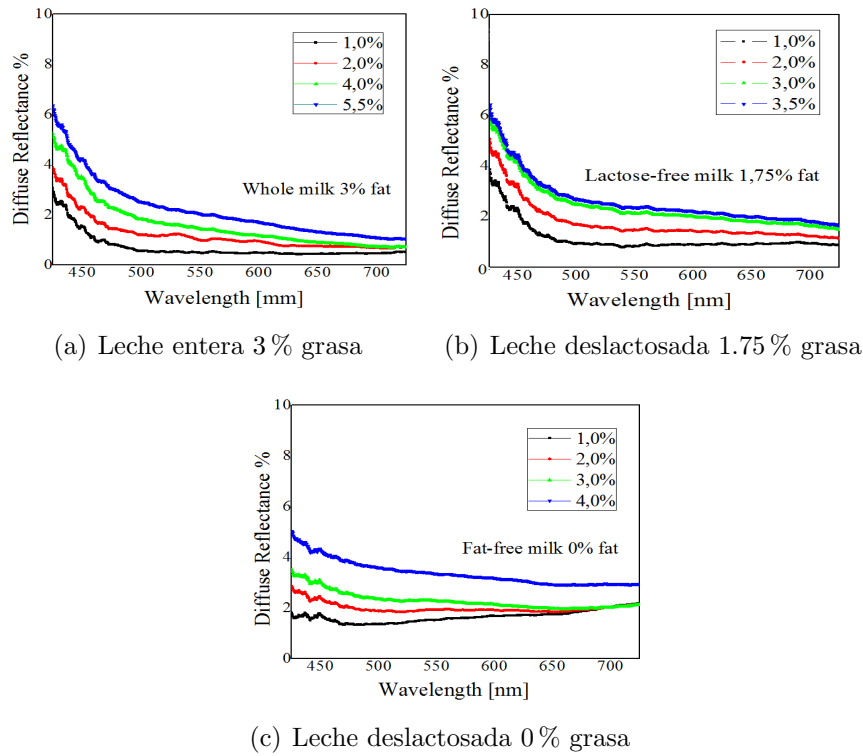


Figura 22: Mediciones de reflectancia difusa para *phantoms* de diferentes concentraciones.

Para las mediciones de transmitancia difusa en la fig.23 se volvieron a utilizar concentraciones de lípido desde 0,1 % hasta 1 %, las variaciones de forma son pequeñas, aunque hay diferencia en los valores para los tres tipos y para las distintas concentraciones de los *phantoms*, es un comportamiento similar al de la transmitancia colimada pero con valores mucho más altos.

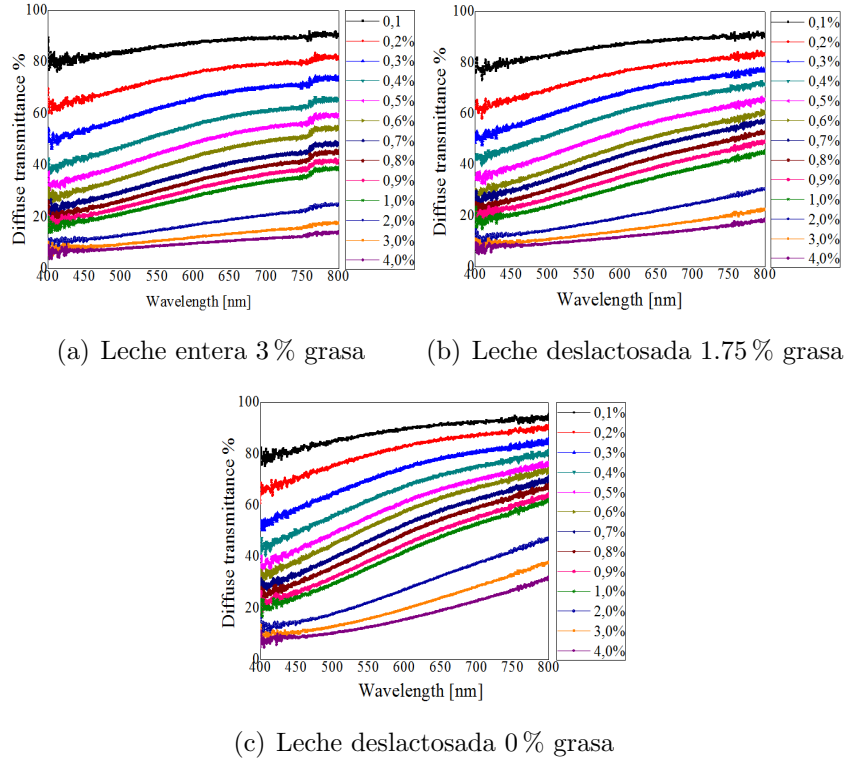
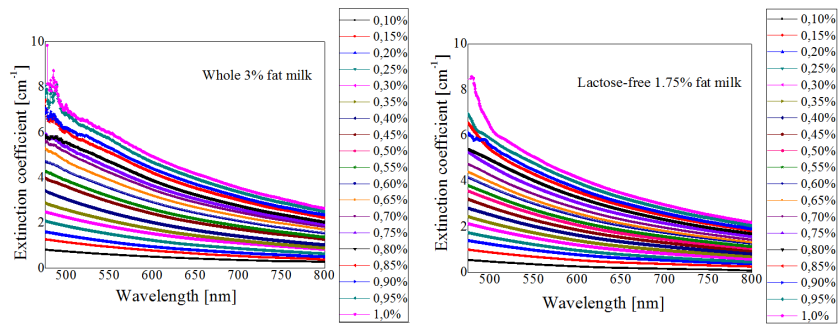


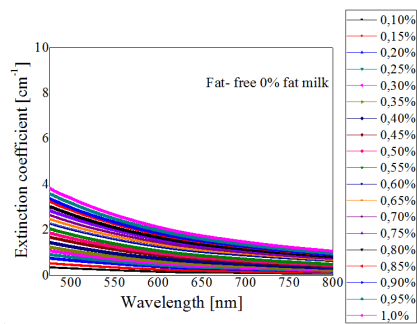
Figura 23: Mediciones de transmitancia difusa para diferentes concentraciones de lípido.

Con los datos obtenidos de T_c %, se graficó la dependencia entre el coeficiente de extinción total con la longitud de onda usando la ley de Beer-Lambert para una muestra de 1 *cm* espesor como se presenta en la fig. 24. De las mediciones difusas se obtuvo la dependencia entre la razón de Kubelka Munk K/S con la longitud de onda, mostrada en la fig. 25. A partir de los coeficientes efectivos de KM y μ_t se lograron obtener los coeficientes ópticos de los *phantoms* utilizando el método presentado por Van Gemert *et al* [25], los valores experimentales para el coeficiente de absorción μ_a y de scattering μ_s para *phantoms* con concentración 1,0 % se estimaron y su dependencia con la longitud de onda se graficó como se muestra en la fig. 26, presentando valores más altos para el esparcimiento que para la absorción, como era de esperarse, ya que son medios turbios.



(a) Leche entera 3 % grasa

(b) Leche deslactosada 1.75 % grasa



(c) Leche deslactosada 0 % grasa

Figura 24: Coeficiente de extinción total vs longitud de onda para diferentes concentraciones de lípido.

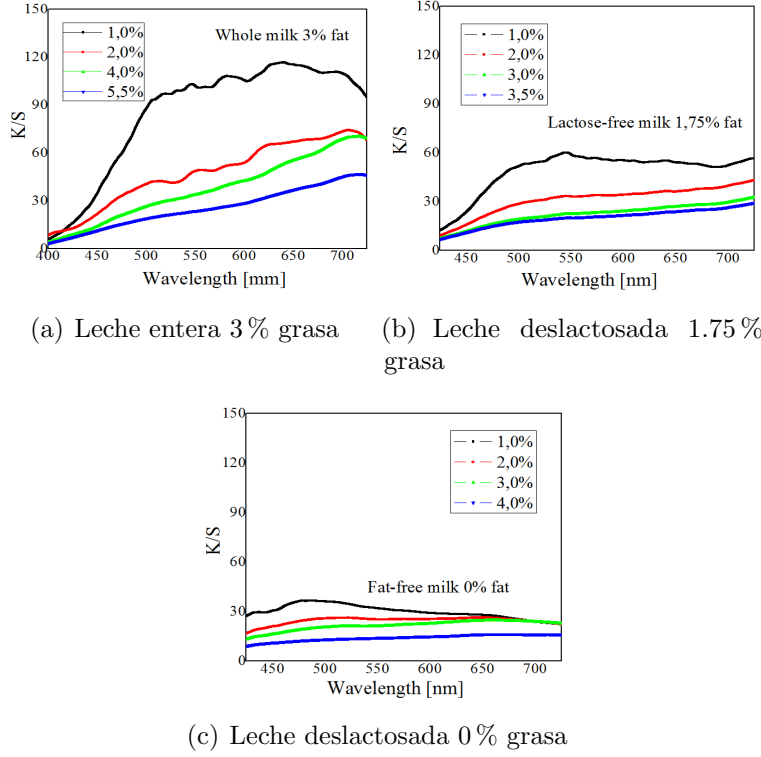


Figura 25: Razón de los coeficientes de Kubelka Munk K/S vs. longitud de onda.

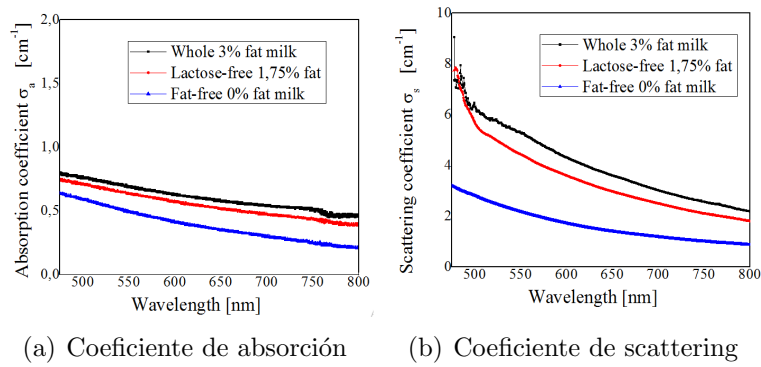


Figura 26: Constantes ópticas vs. longitud de onda para *phantoms* de 1,0 % de lípido.

En la segunda parte se añadió el material absorbedor y las mediciones de transmitancia colimada se muestran en la fig. 27, la absorción debida a la tinta china roja se presenta alrededor de $555 \pm 0,3 \text{ nm}$ y el efecto de cada componente se puede observar, es decir, en (a) la absorción aumenta al incrementar la concentración de tinta y en (b) el scattering aumenta al incrementar la cantidad de leche; comparando esto con las mediciones de T_c % de lípido solo se observa el mismo comportamiento creciente con la longitud de onda.

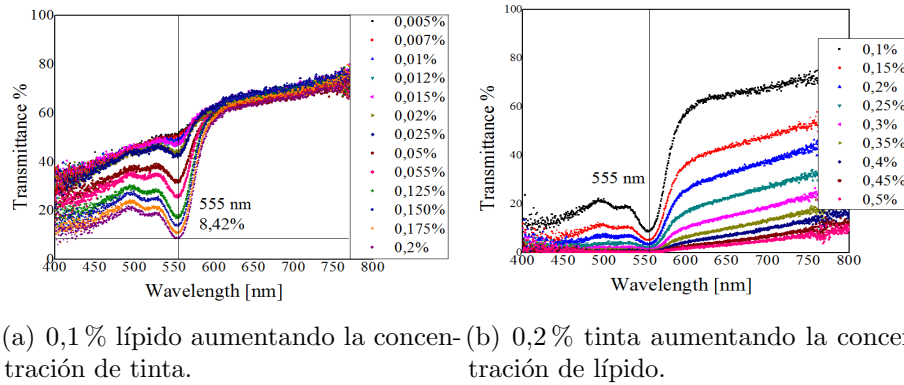


Figura 27: Mediciones de transmitancia colimada de los *phantoms* con la adición de tinta china roja.

También se presenta en la fig. 28 la dependencia entre el coeficiente de extinción total μ_t con la longitud de onda para un *phantom* de leche entera de 0,1 % de concentración.

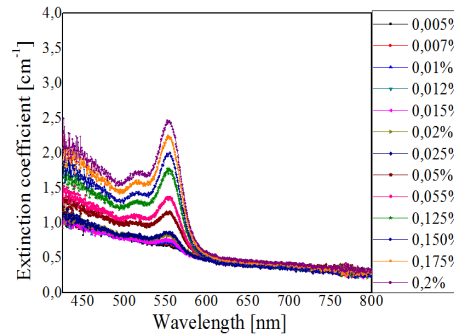


Figura 28: Coeficiente de extinción total vs longitud de onda para diferentes concentraciones de tinta.

La fluorescencia se observó excitando las muestras con los láseres azul violeta 405 nm y verde 532 nm , y con los LEDs señalados en el espectro mostrado en la fig. 29 (b), para los LED de 590 nm y 640 nm no se observó fluorescencia. El espectro presenta un pico en 586 nm con un corrimiento de Stokes de $31 \pm 0,3\text{ nm}$, se presentan también unos picos de pequeña intensidad, para excitación con los LED ultravioleta, están en el infrarrojo cercano, fuera de la región de nuestro interés.

En la fig. 30 se muestran fotografías de los *phantoms*, tanto en la parte superior como en la inferior el tercer *phantom* de izquierda a derecha es el de referencia, es decir, solamente agua desmineralizada, en el medio se tiene agua+tinta y el primero es agua+leche+tinta y agua+leche en cada caso. En las imágenes se pueden visualizar los distintos procesos de propagación de la luz como transmitancia, fluorescencia, absorción y difusión, y podría llevarse a cabo un análisis más a fondo con las mismas.

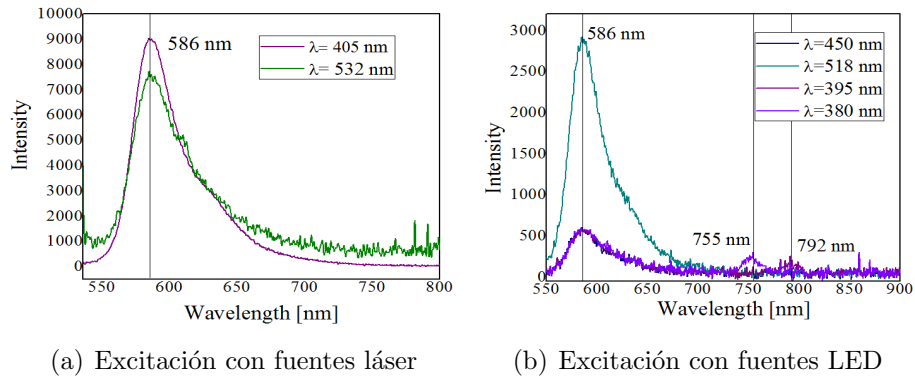


Figura 29: Espectro de fluorescencia.

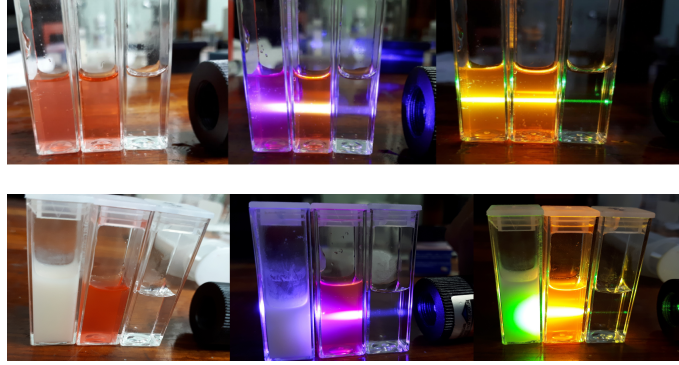


Figura 30: Fotografías de la fluorescencia observada.

Teniendo en cuenta los coeficientes obtenidos y las longitudes de onda para las cuales se observó fluorescencia se puede definir la VOB apta para estos *phantoms*, que estaría alrededor de 590 nm hasta 750 nm , región donde se presenta una alta transmitancia, es decir baja absorción de la luz, así como menor scattering. En la fig. 31 se resalta esta ventana para las mediciones realizadas con leche entera.

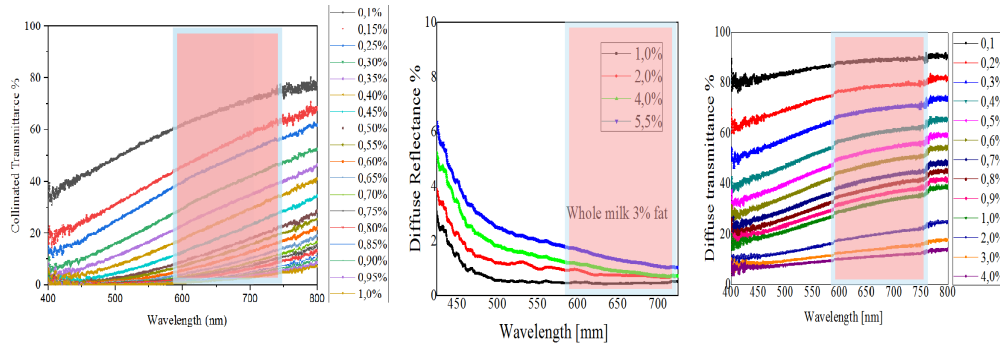


Figura 31: VOB en las mediciones de leche entera 3 % grasa.

Se podría ahora analizar los valores de los coeficientes ópticos de nuestros *phantoms* dentro de esta ventana, como podría ser el caso de μ_s por ejemplo alrededor de la longitud de onda 630 nm , que toma un valor de aproximadamente 2 cm^{-1} para leche entera (para compararlo con los valores presentados en la tabla de la fig. 41 para tejidos reales); considerando que el coeficiente de anisotropía para tejidos está entre de 0,65 y 0,95 vemos que para 1,0 % de leche

entera el valor del coeficiente de scattering es alrededor de un orden de magnitud menor que en los tejidos reales, por lo que se necesita una concentración más alta de lípido para emularlos.

6.2. Caracterización del *phantom* pulsátil

Se realizó un ajuste lineal de los datos de calibración (caudal o velocidad de flujo en función de la velocidad de la bomba) a la recta $Caudal = mRPM$, para el agua se obtuvo una pendiente $m = 14,92 \pm 0,24 [mL/rev]$ y para el phantom $14,88 [mL/rev]$, al graficar ambos conjuntos de datos vemos que el se pueden ajustar a una sola línea, como se muestra en la fig. 32, se obtuvo una pendiente de $14,90 mL/rev$. Este valor se compara con la dosis calibración realizada en la bomba, que arrojó un valor de $14,74 mL/rev$ en pantalla, presentando un error porcentual de 1,1 %, confirmando así que el valor de calibración de la bomba peristáltica solamente depende del diámetro de las mangueras y no del fluido empleado.

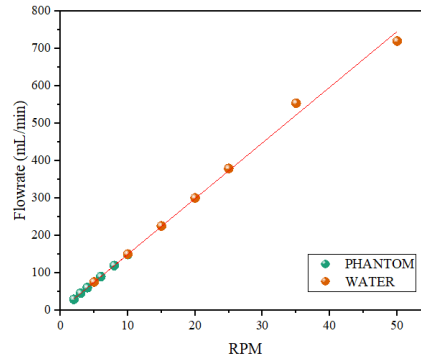


Figura 32: Caudal vs. velocidad de la bomba.

De acuerdo a la teoría de fluidos la función lineal que tenemos en la ec. 18 nos da la relación entre la velocidad de “flujo sanguíneo” (BFR por sus iniciales en inglés) y la velocidad RPM, donde r es el radio interno de la manguera y R el radio externo del rotor de la bomba, el factor 10^6 es para convertir las unidades de BFR a mL/min . Área y longitud se refieren a la parte ocluida de

la manguera.

$$\begin{aligned}
BFR &= Area * Longitud * RPM \\
&= \pi r^2 * 2\pi R * RPM \\
BFR &= 2\pi^2 r^2 R 10^6 RPM
\end{aligned} \tag{18}$$

En este caso se reemplazan $r \approx 0,0048 \text{ m}$, $R \approx 0,035 \text{ m}$, y por lo tanto obtenemos $BFR = 15,92 \text{ RPM}$. La pendiente $15,92 \text{ mL/min}$ puede compararse con la dosis de calibración y obtendríamos un error de 7,4 %, que es razonable ya que puede atribuirse al hecho de que la sección transversal de las mangueras no es un círculo cuando están ocluidas, además que el rotor de la bomba tampoco es un círculo exacto, como se muestra en la fig. 34.

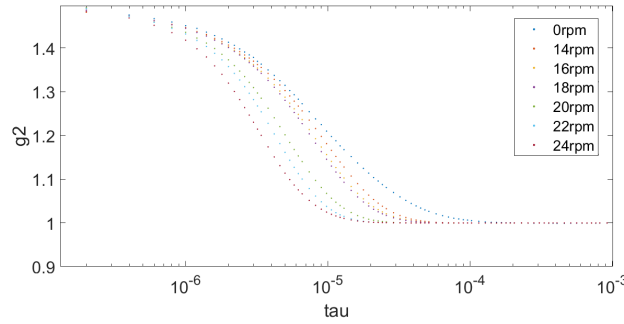
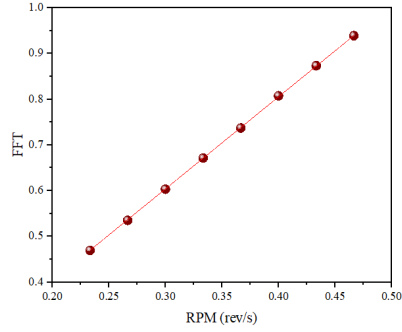
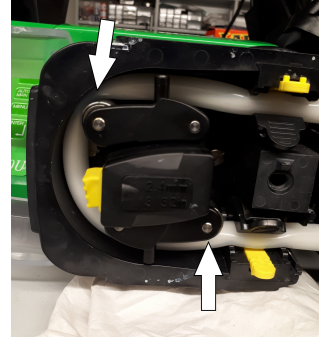


Figura 33: Función de autocorrelación temporal medida para distintas velocidades de la bomba.

En la fig. 33 se muestra la función de autocorrelación ‘ g_2 ’ para diferentes velocidades, y se observa que al aumentar la velocidad la curva decae más rápido, como se esperaba y se observa en la fig. 6. del paper de Dong *et. al.* [58] para distintas velocidades de flujo. Después de ajustar los datos al modelo y extraer su FFT se obtuvieron los picos que dan cuenta del comportamiento pulsátil, graficando la posición de los mismos vs. la velocidad se obtiene la recta presentada en la fig. 34, cuya pendiente fue $2,0131 \text{ [pulsos/rev]}$, lo que significa que se generan 2 pulsos por cada revolución, lo que tiene sentido ya que la bomba tiene dos rodillos, que se señalan en la fig. 34.



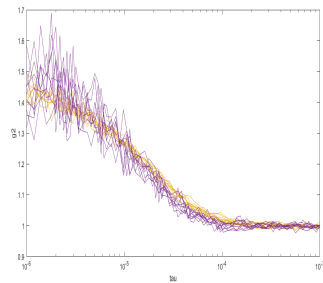
(a) FFT vs. RPM.



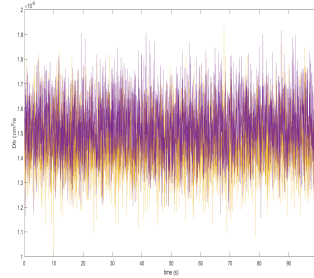
(b) Rotor de la bomba.

Figura 34: Caracterización del comportamiento pulsátil.

Se comparan las mediciones directamente en el contenedor y en el tubo, en la fig. 35 se muestra la gráfica en escala semilogarítmica de 10 curvas de autocorrelación temporal, y el BFi promedio en cada caso. A partir de esto se concluye que no hay efectos de *light channeling* al medir en el tubo a través de la ventana de mylar. Vale la pena aclarar que en los resultados hasta ahora se han ajustado los datos utilizando el modelo de BDM y la geometría semi-infinita, es decir, lo más común, donde el BFi está dado por D_b [cm^2/s].



(a) Función de autocorrelación g_2 vs. τ .



(b) BFi vs. tiempo.

Figura 35: Mediciones sin flujo (0 rpm).

Ahora, se ajustaron los datos medidos utilizando los tres modelos de flujo y en la fig. 36 se muestran los resultados para una sola velocidad (24 rpm), ya que se observó comportamiento similar para las otras. Los puntos representan el

promedio de las mediciones durante aprox. 200 s y las líneas sólidas son las funciones teóricas; se observa que el modelo de RFM decae más rápidamente que el BDM, lo que está de acuerdo con otros artículos, como el de Carp *et al.* en 2011[60], y se evidencia con los residuos que el mejor ajuste es el modelo que tiene en cuenta ambos fenómenos BDM + RFM.

La información de la pulsatilidad en el BFi está en D_b para BDM, y en V_{RBC} para el RFM y para el de la suma, como se muestra en la fig. 37 para una ventana de medición de 10 s, vemos que la forma de la función permite distinguir los picos superiores (sístole) y los valles (diástole), por lo que se analizó de nuevo el ajuste con los tres modelos para estos puntos, como se representa en la fig 38 para 10 curvas individuales, confirmando que la suma es el mejor ajuste a los datos experimentales, en el que nuestro BFi será V_{RBC} , con unidades de velocidad cm/s .

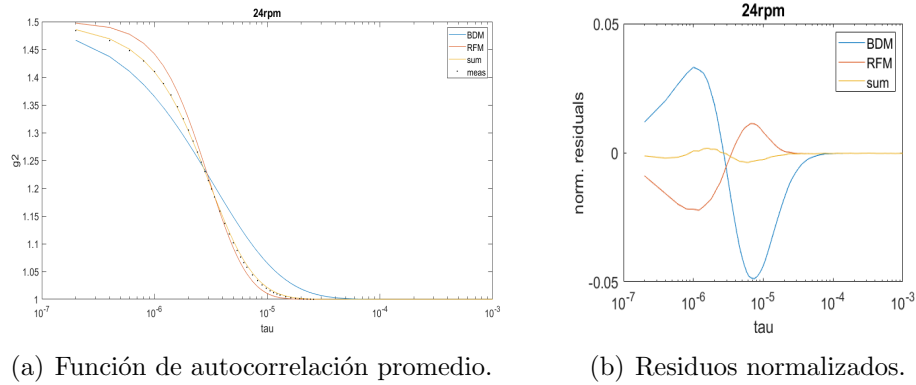


Figura 36: Comparación del ajuste con los tres modelos para 24 rpm.

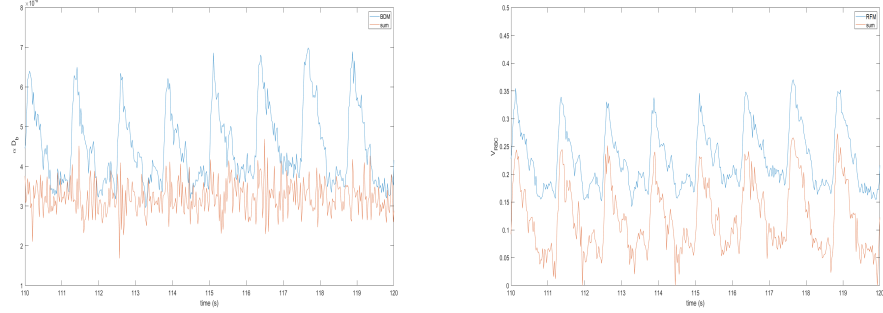


Figura 37: BFi vs. tiempo para los distintos modelos (24 rpm).

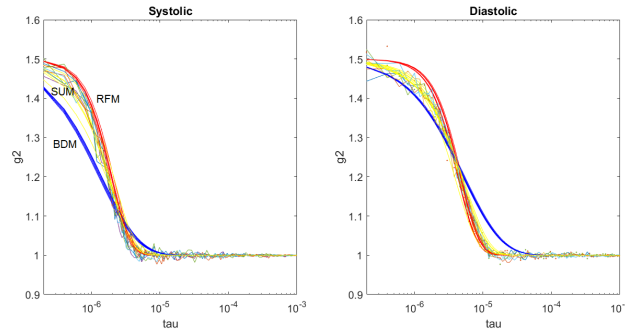


Figura 38: Comparación de los tres modelos para curvas sistólicas y diastólicas.

Hasta este punto se ha utilizado la geometría semi-infinita, así que ahora se ajustan los datos utilizando la geometría de lámina infinita para saber si la limitación de tamaño del diámetro del tubo (3,5 cm) comparado con la SDS (1 cm) tiene algún efecto. En la fig 39 se representan los resultados para 24 rpm considerando el modelo de la suma, que fue el mejor ajuste y el BDM, que es el más utilizado; en ambos casos se observa que no hay diferencia notable en el ajuste (la comparación se realizó para diferentes grosores de la lámina, menores que el diámetro del tubo, y truncando la suma a 7 términos), por lo que la solución semi-infinita es buena opción.

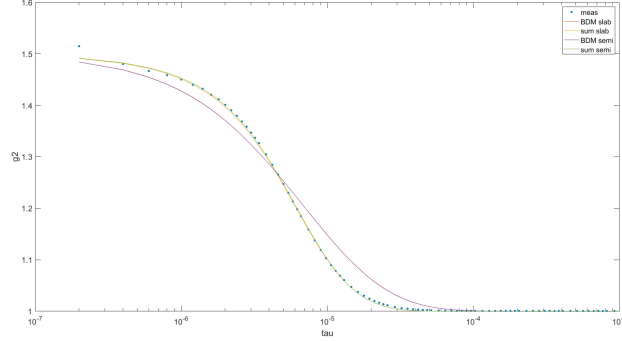


Figura 39: Comparación del ajuste con distintas geometrías (24 rpm).

Finalmente se decide que se utilizará el modelo BDM+RFM con la geometría semi-infinita para ajustar la función de autocorrelación a la solución de la CDE, se realizan mediciones para distintas velocidades de flujo (desde 20 rpm hasta 40 rpm), se ajustan los resultados y se muestran las FFT de V_{RBC} en la fig. 40, donde se observa que en todos los casos el pico más alto corresponde al doble de la frecuencia de rotación de la bomba peristáltica, y también se logran ver algunos armónicos.

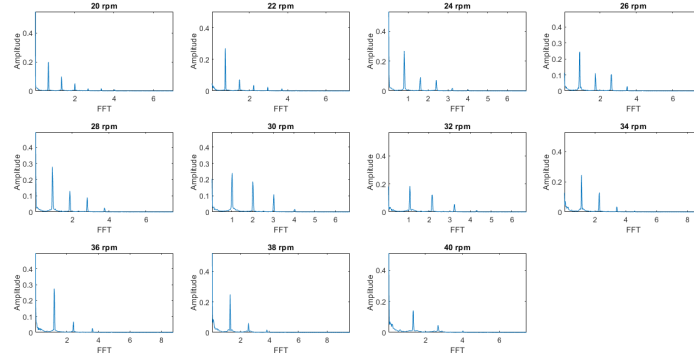


Figura 40: Transformada de Fourier del BFi para diferentes velocidades de flujo.

7. Conclusiones y Perspectivas

En este estudio se prepararon exitosamente *phantoms* líquidos basados en lípidos de bajo costo, utilizando distintas concentraciones de leche comercial con distintos porcentajes de grasa y tinta china roja. Mediante un montaje óptico simple se realizaron mediciones espectroscópicas de reflectancia y transmitancia en el rango visible de los *phantoms* que simulaban las propiedades ópticas de tejido. En adición, con las mediciones de fluorescencia se caracterizó el medio permitiendo determinar un rango VOB que permitiría lograr una mejor visualización de heterogeneidades en la muestra.

A partir de las mediciones colimadas y difusas se lograron estimar los coeficientes de absorción y scattering mediante un protocolo basado en la aproximación del modelo de dos flujos de Kubelka Munk usando la geometría de placas o láminas, con la suposición de que el índice de refracción del medio es igual al de sus alrededores. En general, se mostró la posibilidad de identificación espectroscópica y control de los distintos tipos de componentes de nuestro medio turbio, en este caso leche, y se ilustra un sistema para estudios preliminares en óptica biomédica y biofotónica.

Además, se realizó el montaje para un *phantom* pulsátil de propiedades ópticas conocidas utilizando una bomba peristáltica. Se caracterizó su flujo y se midió para diferentes velocidades utilizando espectroscopía de correlación difusa. Los datos de DCS se ajustaron a diferentes soluciones a la CDE para distintos modelos y geometrías, concluyendo que el mejor ajuste es la geometría semi-infinita y el modelo RFM+BDM, lo que está de acuerdo con algunos artículos de la literatura. Asimismo, se extrajo el BFi que lleva información acerca del comportamiento pulsátil del medio.

Con respecto a las constantes ópticas obtenidas, ahora se puede basar en esa información para encontrar la concentración necesaria y preparar *phantoms* con las propiedades ópticas típicas de los tejidos, resumidas en la tabla de la fig. 41. Sobre el protocolo aquí desarrollado, el siguiente paso sería emplearlo para estimar los coeficientes ópticos de otros *phantoms*, como los basados en Lipofundin[®], que es una emulsión que ha sido ampliamente caracterizada, para poder así comparar los valores obtenidos por otros grupos de investigación

con los que arroje este método, y poder así calificar la calidad del mismo. En caso de ser comparables sería relevante para el grupo de óptica cuántica en la Universidad del Valle, ya que permitiría conocer las propiedades ópticas con un montaje espectroscópico de bajo costo, y posteriormente avanzar en mediciones que permitan implementar técnicas de imagenología.

Acerca de la pulsatilidad, a lo largo de los años se han definido distintos índices en Ultrasonido Doppler debido a la dificultad para evaluar la pulsatilidad absoluta. Uno de los potenciales biomarcadores que tienen en cuenta la variabilidad del flujo sanguíneo cerebral es el Índice de Pulsatilidad de Gosling (PI), que se calcula como la diferencia entre las velocidades sistólica y diastólica sobre la velocidad promedio. Recientemente, gracias a los avances en la resolución temporal de DCS se ha evaluado este índice (para el BFi) y su relación con diferentes parámetros como lo es la presión intracranial (ICP), por esta razón se quiere estimar la pulsatilidad de manera precisa. La construcción de este phantom pulsátil permite evaluar en un sistema controlado qué factores afectan los cambios de este índice, al realizar mediciones a distintas velocidades de flujo, variando la intensidad del láser, así como también midiendo a diferentes SDS.

A. Anexos

A.1.

Medio Infinito	Medio semi-infinito	Lámina infinita
r_s posición de una fuente isotrópica puntual $k = \sqrt{\frac{(\mu_a c_0 - i\omega)}{D}}$	ρ separación entre la fuente y el detector $r_1 = \sqrt{(z - l_{tr})^2 + \rho^2}$ $r_b = \sqrt{(z + 2z_b + l_{tr})^2 + \rho^2}$ $z_b = 2l_{tr} \frac{1+R_{eff}}{3(1-R_{eff})}$ $R_{eff} = -1,440n^{-2} + 0,710n^{-1} + 0,668 + 0,06363n$ $n = \frac{n_{in}}{n_{out}}$	m es un entero d espesor de la lámina o placa $r_{\pm,m} = \sqrt{\rho^2 + (z - z_{\pm,m})^2}$ $z_{+,m} = 2m(d + 2z_b) + l_{tr}$ $z_{-,m} = 2m(d + 2z_b) - 2z_b - l_{tr}$

Tabla 3: Notación para cada solución de la CDE.

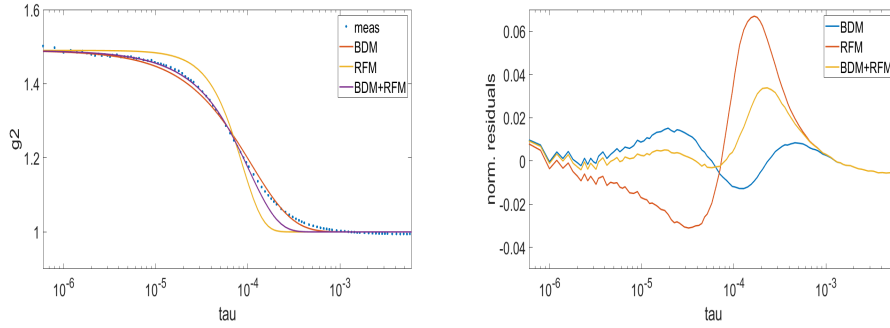
Tejido	Origen	λ	μ_a	μ'_s
Mama sana	Humano	750 nm	$0,046 \pm 0,024 \text{ cm}^{-1}$	$8,7 \pm 2,2 \text{ cm}^{-1}$
		786 nm	$0,041 \pm 0,025 \text{ cm}^{-1}$	$8,5 \pm 2,1 \text{ cm}^{-1}$
		830 nm	$0,046 \pm 0,027 \text{ cm}^{-1}$	$8,3 \pm 2,0 \text{ cm}^{-1}$
Higado			6 cm^{-1}	
Musculo	Bovino	630 nm	$1,5 \text{ cm}^{-1}$	7 cm^{-1}
		630 nm	$1,66 \text{ cm}^{-1}$	$4,38 \text{ cm}^{-1}$
		1064 nm	$1,18 \text{ cm}^{-1}$	$2,81 \text{ cm}^{-1}$
Cerebro	Cerdo		$0,26 \text{ cm}^{-1}$	57 cm^{-1}
	Humano	700 – 900 nm	$1,2 \text{ cm}^{-1}$	$20 - 50 \text{ cm}^{-1}$

Figura 41: Constantes ópticas para tejidos reales [61].

A.2.

Se tomaron también mediciones de *fastDCS* en un sujeto humano siguiendo el protocolo de *arm cuff occlusion*, u oclusión arterial del brazo, cada etapa con una duración de aproximadamente 2 minutos y 30 segundos. Primero se midió en estado de reposo, luego, utilizando un torniquete a una presión $P = 120mmHg$, y posteriormente se desinfló el torniquete.

Los datos se ajustaron a los tres modelos de flujo mencionados previamente, en la fig. 42 los puntos representan el valor medio de la etapa de reposo (aprox. 140 s) y las líneas sólidas son las funciones teóricas. Se observa el ajuste más robusto es el caso del BDM, por lo que será ese el seleccionado para realizar el análisis de las mediciones.



(a) Función de autocorrelación promedio. (b) Residuos normalizados.

Figura 42: Comparación del ajuste con los tres modelos de flujo.

En la fig. 43 se pueden observar los cambios en el BFi (BDM) debido a la restricción de flujo sanguíneo hacia la extremidad superior, la primera parte corresponde a la línea de base en estado de reposo, luego se ve la disminución de flujo hasta ser prácticamente cero, y cuando se desinfla el torniquete se tiene un aumento notable del flujo hacia el brazo llamado periodo de hiperemia.

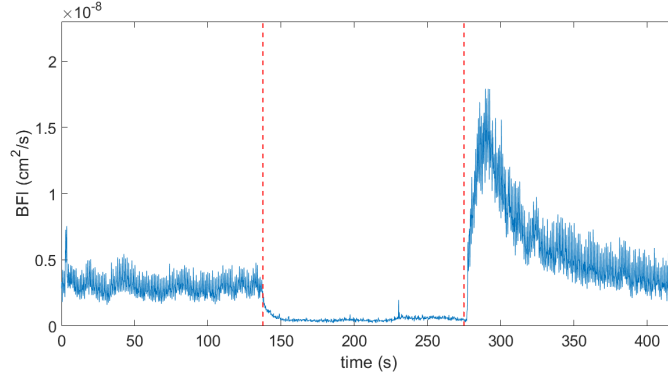


Figura 43: BFi vs tiempo: protocolo oclusión arterial de brazo.

Finalmente, a partir del comportamiento pulsátil del índice de flujo sanguíneo se puede extraer información de la frecuencia cardíaca, en la fig. 44 se presenta una ventana de 10 s del BFi filtrado en la etapa 1, que corresponde al reposo, así como la transformada de Fourier para las tres etapas. En la etapa 1 la frecuencia del primer pico $f_{hr} = 0,9766 \text{ Hz}$ corresponde a una frecuencia cardíaca de aproximadamente 58 *bpm*, en la etapa 2 no se detecta frecuencia cardíaca ya que no hay flujo, y en la etapa 3 hay un pequeño corrimiento debido a la compensación, siendo $f_{hr} = 1,0517 \text{ Hz}$, que corresponde a 63 *bpm*.

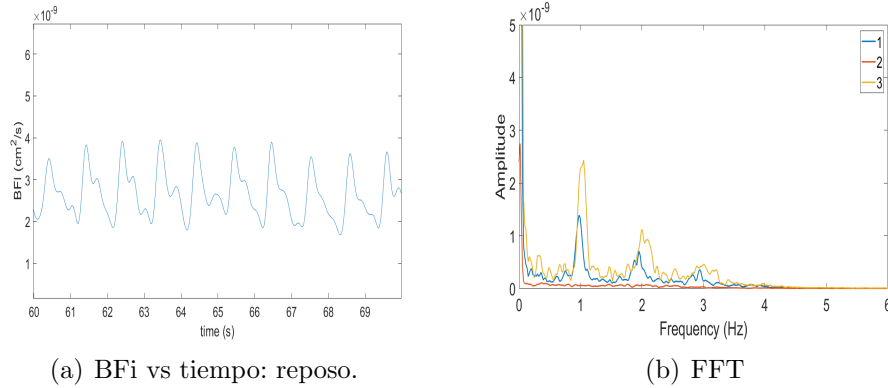


Figura 44: Transformada de Fourier del BFi para las tres etapas del protocolo.

A.3.

A continuación se presenta un listado de las participaciones en eventos, publicaciones y reconocimientos relacionados con este trabajo.

A.3.1. Participación en eventos modalidad poster

1. **Caracterización espectroscópica de un modelo simple de tejido biológico blando**
XXVIII Congreso Nacional de Física
Universidad del Quindío, Armenia, Colombia (2019).
2. **Spectroscopic Characterization of Low Cost Phantoms**
ICFO-UNAM International Schools on the Frontiers of Light
UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, México (2019).

A.3.2. Participación en eventos modalidad presentación oral

1. **Propiedades ópticas de un modelo simple de tejido biológico blando**
XVI ENO VII CANCOA Encuentro Nacional de Óptica
Universidad de Córdoba, Montería, Colombia (2019).
2. **Optical properties of a simple model of soft biological tissue**
Light Research Café: Junior Explosion!
Universitat Politècnica de Catalunya Terrassa, España (2021).

A.3.3. Publicaciones

1. **Optical properties of a simple model of soft biological tissue**
C Fajardo and E Solarte
J. Phys.: Conf. Ser. 1547 012026 (2020).

A.3.4. Reconocimientos

1. International Travel Fellowship

Beca de viaje otorgada por OSA para asistir a ICFO-UNAM International School on the Frontiers of Light: Biophotonics. Querétaro, México (2019).

2. ICFO Student Research Fellowship

Pasantía de investigación en el grupo de óptica médica liderado por el Prof. Dr. Turgut Durduran, bajo la supervisión de los doctorandos Jonas B. Fischer y Veronika Parfentyeva. Instituto de Ciencias Fotónicas. Barcelona, España (2021).

3. HST-Wellman Summer Institute for Biomedical Optics

Pasantía de investigación remota en el grupo liderado por el MD/PhD. Aaron Aguirre, bajo la supervisión de Dr. Anand Chandrasekhar. Harvard-MIT (2021).

4. 2021 Siegman International School on Lasers

Beca de registro otorgada por OSA para asistir a la escuela online. Presentada por OSA y co-fundada con IPG Photonics (2021).

Referencias

- [1] P. N. Prasad, *Introduction to Biophotonics* (John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2003).
- [2] V. Tuchin, *Physics-Uspekhi* **40**, 495 (1997).
- [3] E. Solarte and E. Ipus, in *Design and Performance Validation of Phantoms Used in Conjunction with Optical Measurement of Tissue V*, Vol. 8583, edited by R. J. Nordstrom, International Society for Optics and Photonics (SPIE, 2013) pp. 52 – 61.
- [4] B. Aernouts, *Optical Characterization of Milk*, Ph.D. thesis, KU Leuven (2014).
- [5] H. G. Hecht, *Journal of research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and chemistry* **80A**, 567—583 (1976).
- [6] A. Kirkland, *Optics and Photonics News* **2019**, 12 (2019).
- [7] B. W. Pogue and M. S. Patterson, *Journal of Biomed. Opt.* **11**, 1 (2006).
- [8] M. Mokbul, *Journal of Medical Engineering* **2017**, 1 (2017).
- [9] T. Meyer, M. Schmitt, O. Guntinas-Lichius, and J. Popp, *Optics and Photonics News* **2019**, 12 (2019).
- [10] A. H. Hielscher, A. Y. Bluestone, G. S. Abdoulaev, A. D. Klose, J. Lasker, M. Stewart, U. Netz, and J. Beuthan, *Disease Markers* **18**, 313 (2002).
- [11] D. Briers, D. D. Duncan, E. R. Hirst, S. J. Kirkpatrick, M. Larsson, W. Steenbergen, T. Stromberg, and O. B. Thompson, *Journal of Biomedical Optics* **18**, 1 (2013).
- [12] H. M. Varma, C. P. Valdes, A. K. Kristoffersen, J. P. Culver, and T. Durduran, *Biomed. Opt. Express* **5**, 1275 (2014).
- [13] C. P. Valdés Escobar, *New laser speckle methods for in vivo blood flow imaging and monitoring*, Phd thesis, AMU - Aix Marseille Université ; Universitat Politècnica de Catalunya (2014).

- [14] C. P. Valdes, H. M. Varma, A. K. Kristoffersen, T. Dragojevic, J. P. Culver, and T. Durduran, *Biomed. Opt. Express* **5**, 2769 (2014).
- [15] Y. Shang, T. Li, and G. Yu, *Physiological Measurement* **38**, R1 (2017).
- [16] T. Durduran, R. Choe, W. B. Baker, and A. G. Yodh, *Reports on Progress in Physics* **73**, 076701 (2010).
- [17] L. Cortese, G. L. Presti, M. Pagliazzi, D. Contini, A. D. Mora, A. Pifferi, S. K. V. Sekar, L. Spinelli, P. Taroni, M. Zanoletti, U. M. Weigel, S. de Fraguier, A. Nguyen-Dihn, B. Rosinski, and T. Durduran, *Biomed. Opt. Express* **9**, 2068 (2018).
- [18] S. Chopra and C. H.M., *Laser in chemical and biological sciences* (New Age International Publisher, New Delhi, 1992).
- [19] F. Martelli, S. D. Bianco, A. Ismaelli, and G. Zaccanti, *Light Propagation through Biological Tissue and Other Diffusive Media* (SPIE Press, Bellingham, Washington, 2010).
- [20] M. Niemz, *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications*, Biological and Medical Physics Series (Springer Berlin Heidelberg, 2004).
- [21] V. Tuchin, *Journal of Biomedical Photonics & Engineering* **1**, 98 (2015).
- [22] R. Mesquita and A. Yodh, *Proceedings of the International School of Physics “Enrico Fermi”* **173**, 51 (2011).
- [23] J. Reichman, *Appl. Opt.* **12**, 1811 (1973).
- [24] R. Watté, B. Aernouts, R. V. Beers, E. Herremans, Q. T. Ho, P. Verboven, B. Nicolai, and W. Saeys, *Opt. Express* **23**, 17467 (2015).
- [25] M. J. Van Gemert, A. J. Welch, W. M. Star, M. Motamedi, and W.-F. Cheong, *Lasers in medical Science* **2**, 295 (1987).
- [26] J. R. Lorenzo, *Principles of Diffuse Light Propagation* (World Scientific, 2012).
- [27] D. A. Boas, *Diffuse photon probes of structural and dynamical properties of turbid media: theory and biomedical applications.*, Phd thesis, University of Pennsylvania (1996).

- [28] W. Demtröder, *Laser Spectroscopy Vol. 2: Experimental Techniques* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008).
- [29] B. J. Ackerson, R. L. Dougherty, N. M. Reguigui, and U. Nobbmann, *Journal of Thermophysics and Heat Transfer* **6**, 577 (1992), <https://doi.org/10.2514/3.11537>.
- [30] R. Dougherty, B. Ackerson, N. Reguigui, F. Dorri-Nowkoorani, and U. Nobbmann, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **52**, 713 (1994).
- [31] K. Verdecchia, M. Diop, L. Morrison, T.-Y. Lee, and K. St Lawrence, *Biomedical Optics Express* **6**, 4288 (2015).
- [32] A. Shahin and W. Bachir, *Polish Journal of Medical Physics And Engineering* **23**, 121 (2017).
- [33] P. Ninni, F. Martelli, and G. Zaccanti, *Physics in medicine and biology* **56**, N21 (2011).
- [34] C. De Caro and H. Claudia, *UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications* (Mettler-Toledo Publication, 2015).
- [35] O. O. Inc., *USB4000 Fiber Optic Spectrometer: Installation and Operation Manual* (Ocean Optics Inc., 2006).
- [36] T. Owen and A. Technologies, *Fundamentals of UV-visible Spectroscopy: A Primer* (Agilent Technologies, 2000).
- [37] W. Demtröder, *Laser Spectroscopy: Vol. 1: Basic Principles*, *Laser Spectroscopy* (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
- [38] G. Yu, T. Durduran, C. Zhou, R. Cheng, and A. G. Yodh, “Near-infrared diffuse correlation spectroscopy for assessment of tissue blood flow,” in *Handbook of Biomedical Optics* (CRC Press, 2011).
- [39] E. M. Buckley, A. B. Parthasarathy, P. E. Grant, A. G. Yodh, and M. A. Franceschini, *Neurophotonics* **1** (2014).
- [40] Q. Ma and X. Su, *Analyst* **135**, 1867 (2010).
- [41] P. Targowski and M. Iwanicka, *Applied Physics A* **106** (2011).

- [42] D. Briers, *Optica Applicata* **37** (2007).
- [43] A. Fishell, E. Richter, C. Valdes, M. Torres, A. Eggebrecht, C. Smyser, A. M. Arbeláez, and J. Culver, in *Clinical and Translational Neurophotonics 2019*, Vol. 10864, edited by S. J. Madsen, V. X. D. Yang, and N. V. Thakor, International Society for Optics and Photonics (SPIE, 2019).
- [44] W. B. Baker, A. B. Parthasarathy, K. P. Gannon, V. C. Kavuri, D. R. Busch, K. Abramson, L. He, R. C. Mesquita, M. T. Mullen, J. A. Detre, J. H. Greenberg, D. J. Licht, R. Balu, W. A. Kofke, and A. G. Yodh, *J Cereb Blood Flow Metab.* **37** (2017).
- [45] A. Parthasarathy, K. Gannon, W. Baker, C. Favilla, R. Balu, S. Kasner, A. Yodh, J. Detre, and M. Mullen, *J Cereb Blood Flow Metab.* **38** (2018).
- [46] A. Ruesch, J. Yang, S. Schmitt, D. Acharya, M. A. Smith, and J. M. Kainerstorfer, *Biomed. Opt. Express* **11** (2020).
- [47] J. Fischer, A. Ghouse, S. Tagliabue, F. Maruccia, A. Rey-Perez, M. Báguena, P. Cano, R. Zucca, U. Weigel, J. Sahuquillo, M. Poca, and T. Durduran, *J Neurotrauma* **37** (2020).
- [48] D. Wang, W. Baker, H. He, P. Gao, Q. Peng, Z. Li, F. Li, T. Chen, and H. Feng, *Neurophotonics* **6** (2019).
- [49] S. Jacques, *Physics in medicine and biology* **58**, R37 (2013).
- [50] J. Hebden, D. Price, A. Gibson, and G. Royle, *Physics in medicine and biology* **51**, 5581 (2006).
- [51] B. Aernouts, E. Zamora-Rojas, R. V. Beers, R. Watté, L. Wang, M. Tsuta, J. Lammertyn, and W. Saeys, *Opt. Express* **21**, 32450 (2013).
- [52] B. Aernouts, R. V. Beers, R. Watté, J. Lammertyn, and W. Saeys, *Opt. Express* **22**, 6086 (2014).
- [53] P. D. Ninni, Y. Bérubé-Lauzière, L. Mercatelli, E. Sani, and F. Martelli, *Appl. Opt.* **51**, 7176 (2012).
- [54] X. Zhou, D. A. Kenwright, S. Wang, J. A. Hossack, and P. R. Hoskins, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* **64**, 53 (2017).

- [55] O. C. Coiado and E. Costa, IFMBE Proceedings **25** (2009).
- [56] F. A. Camfferman, G. M. Ecury-Goossen, J. E. La Roche, N. de Jong, W. van't Leven, H. J. Vos, M. D. Verweij, K. Nasserinejad, F. Cools, P. Govaert, and J. Dudink, *Frontiers in Human Neuroscience* **8**, 1068 (2015).
- [57] R. Bi, Y. Du, G. Singh, C. Ho, S. Zhang, A. Attia, X. Li, and M. Olivo, *Journal of Biomedical Optics* **25**, 1 (2020).
- [58] J. Dong, R. Bi, J. H. Ho, P. Thong, K. Soo, and K. Lee, *Journal of Biomedical Optics* **17** (2012).
- [59] C. Fajardo and E. Solarte, *Journal of Physics: Conference Series* **1547**, 012026 (2020).
- [60] S. Carp, N. Roche-Labarbe, M.-A. Franceschini, V. Srinivasan, S. Sakadzic, and D. Boas, *Biomed. Opt. Express* **2**, 2047 (2011).
- [61] N. Carbone, *Estudio de la formación de imágenes en geometrías de reflectancia usando luz de onda continua en el infrarrojo cercano - Aplicación a la mamografía*, Ph.D. thesis, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (2017).