

# Caracterización de Tejidos Murinos Mediante Vidas Medias de Aniquilación De Positrones.

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LAPLATA**

Facultad de Ciencias Exactas



Departamento de Física

Trabajo de Diploma-Licenciatura en Física Médica

**Roberto Sebastián Tomás**

*Diciembre, 2017*

Directora: Laura Cristina Damonte

Co-directora: Cecilia Yamil Chain

---

*A la memoria de mi Padre*

*Roberto Claudio Tomás*

*(12 de Febrero, 1960-14 de Octubre, 2016)*

## Índice general

### Contenidos

<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1.1. La importancia de la Física en la Biología y la Medicina. . . . .	5
1.2. Antecedentes de estudios PALS en Sistemas de interés en Biología. . . . .	6
1.3. Limitaciones y dificultades de las medidas PALS en Tejidos Biológicos. . . . .	9
<b>2. Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>3. Materiales y metodología</b>	
3.1. Obtención, Conservación y Preparación de las Muestras a Estudiar. . . . .	12
3.1.1 Roedores Utilizados. . . . .	12
3.1.2. Obtención de Muestras. . . . .	13
3.1.3. Método de Conservación y Preparación de Muestras. . . . .	15
3.2. Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en Modo de Medición de Vidas Medias. . . . .	21
3.2.1. Fundamentos Teóricos. . . . .	21
3.2.1.1. Interacción de Positrones con la Materia. . . . .	22
3.2.1.2. Termalización y Difusión de Positrones. . . . .	23
3.2.1.3. Procesos de Aniquilación de Positrones en un Material. . . . .	25
3.2.1.4. Modelo de Atrapamiento. . . . .	27
3.2.1.5. Formación de Positronio. . . . .	28
3.2.1.6. Información Obtenida a Partir de una Medida PALS. . . . .	30
3.2.2. Método Experimental. . . . .	34

3.2.2.1. Fuente de Positrones. . . . .	35
3.2.2.2. Dispositivo experimental. . . . .	38
3.2.2.3. Resolución Temporal y Análisis de Datos. . . . .	42
3.3. Análisis de los resultados: método de análisis de componentes principales. . . . .	47
3.3.1. Análisis de componentes principales: fundamento del método. . . . .	49
3.3.2. Interpretación de los resultados en el método ACP. . . . .	50
<b>4. Resultados</b>	<b>54</b>
4.1. Resultados PALS. . . . .	54
4.2. Resultados ACP. . . . .	59
<b>5. Discusión y Conclusiones</b>	<b>63</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>66</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>69</b>
<b>Apéndice A</b>	<b>71</b>

## **Capítulo 1. Introducción.**

### 1.1. La importancia de la Física en la Biología y la Medicina

El desarrollo de la Física, a lo largo de su historia, ha proporcionado a nuestra sociedad conocimientos y técnicas de alta complejidad, en especial durante el siglo pasado. Su vínculo con otras ciencias, y en particular con la medicina y la biología, ha dotado de una extraordinaria capacidad para la explicación, comprensión y estudio de un amplio espectro de fenómenos que involucran a estas áreas del conocimiento. La Física ha logrado influir profundamente sobre el ejercicio, el desarrollo y la evolución de las ciencias médicas y biológicas contemporáneas. Un hecho trascendental que demuestra esta relación fue el descubrimiento de los rayos X, que se implantó como punto de partida para la subsiguiente introducción y creación de la radiografía como disciplina y método de diagnóstico, lo que significó una auténtica revolución en la práctica médica y en el entendimiento, tratamiento y seguimiento de muchas afecciones de la salud humana.

Los estupendos avances en el conocimiento profundo de la estructura de la materia, tanto a nivel atómico como nuclear, y de las emisiones que átomos y núcleos producen, permitió la aplicación directa de los conceptos y técnicas que proporcionó, en su desarrollo, la física cuántica y nuclear a la solución concreta de los problemas de salud suministrando así nuevos métodos de diagnóstico y tratamientos.

Por todo esto es importante poner en consideración el sustento que la Física Médica le otorga al manejo y a la comprensión de los fundamentos, y las interacciones puestas en juego en las que se basan las tecnologías complejas como lo son en la actualidad la Radioterapia, la Tomografía por Emisión de Positrones, la Resonancia Magnética Nuclear, el Láser, entre otras; ya que son indispensables para su correcta, eficiente y segura aplicación sanitaria.

A mediados del siglo XX surge una técnica nuclear aplicada al estudio de materiales condensados, denominada Espectroscopía de Aniquilación de Positrones (PAS). Dicha

técnica hace uso del hecho de que un positrón (que es la antipartícula del electrón), en cualquier material, encontrará electrones y, luego de un determinado lapso de tiempo, se aniquilará con alguno de ellos emitiendo ondas electromagnéticas propias del proceso. Esta es una técnica analítica no destructiva que posibilita el estudio de la estructura electrónica [1, 2] y defectos en materiales de diversa índole [3].

Existen tres variantes de la técnica PAS que se utilizan para investigar las características de la aniquilación entre positrones, provenientes de una fuente, y los electrones propios del medio material bajo estudio. La primera de ellas es la Correlación Angular de la Radiación de Aniquilación que mide la desviación del ángulo de emisión de los rayos gamma resultantes del proceso de aniquilación de pares. La segunda se denomina Espectroscopía de Ensanchamiento Doppler y mide la fluctuación de la energía de 511 keV producida como resultado de la aniquilación correspondiente. Estas dos técnicas permiten obtener información sobre la estructura del material a partir del principio de conservación de la energía y el momento de las partículas puestas en juego. La tercera variante se conoce como Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en modo de medición de Vidas Medias (PALS), y permite medir de manera aproximada el tiempo de vida que los positrones alcanzan, dentro un material, antes de su definitiva aniquilación. Esta vida útil del positrón es la inversa de su tasa de aniquilación y nos proporciona información sobre la densidad electrónica y el tamaño de los defectos así como del tipo de vacancias, que pudieran encontrarse en la estructura interna del material bajo estudio [4, 5].

## 1.2. Antecedentes de estudios PALS en Sistemas de interés en Biología.

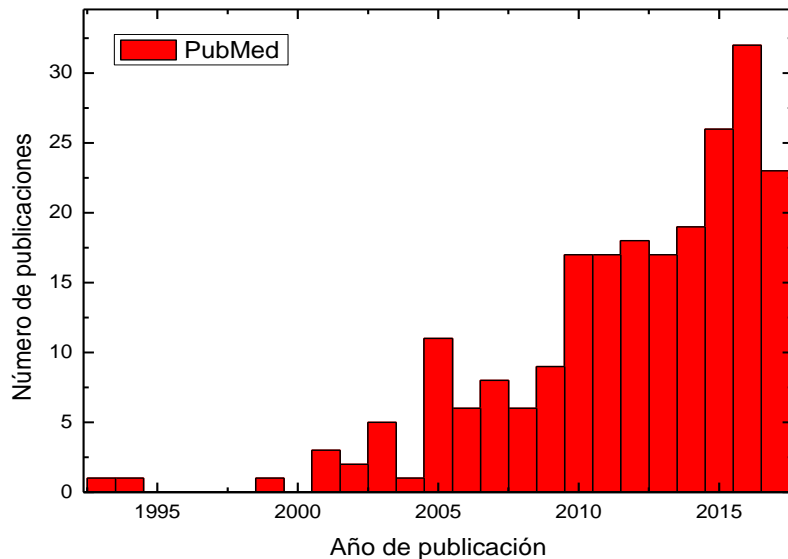
La aniquilación de positrones se manifiesta a partir de la detección de la radiación electromagnética (rayos gamma) resultado de la combinación entre un electrón y un positrón en el seno del material bajo estudio. Uno de los parámetros obtenidos mediante la espectroscopia temporal de aniquilación positrónica es la vida media del positrón que provee información sobre la densidad electrónica y el tamaño de los grupos de vacantes internas que posee la muestra a medir. Si se inyectan positrones dentro de un material

libre de defectos, esta partícula se aniquilará, luego de un cierto tiempo, dentro de la red interna del medio, dando lugar a un tiempo de vida característico. Sin embargo, en presencia de defectos puntuales y zonas dentro del material donde la densidad electrónica disminuye, aumenta la vida media de los positrones ya que hay probabilidades de que algunos de estos queden atrapados en dichos defectos. Es necesario tener en cuenta que sólo son atractivos a los positrones los defectos que poseen una carga neta negativa o nula [3].

Ahora bien, hay casos de materiales donde existe una probabilidad de que ocurra la formación de un estado ligado entre un positrón y un electrón; a dicha configuración se la denomina positronio. En materiales de este tipo, tales como las muestras biológicas de tejidos murinos, también es posible obtener información sobre el tamaño de las cavidades del material, volúmenes libres dentro de éste así como de las características fisicoquímicas de dicho material [5].

La técnica PALS ha sido aplicada al estudio de sistemas biológicos ya desde la década de los sesenta; sin embargo, los datos obtenidos a partir de estos experimentos son escasos en comparación a lo que sucede con las investigaciones realizadas sobre otros tipos de materiales condensados. Además, dichos estudios poseen una gran dispersión e incluso, el análisis de los datos que presentan es poco riguroso, debido principalmente a limitaciones de tipo experimental y teórico [6]. No obstante, con el avance tecnológico de los últimos años, en particular con el gran aporte al mejoramiento de las técnicas experimentales y a los métodos de análisis computacionales, han aumentado considerablemente las investigaciones PALS y, singularmente, aquellas relacionadas con la materia blanda [7-18]. Para tener una idea más acabada de las aplicaciones PALS en sistemas biológicos se puede visitar el sitio PubMed, donde se compilan más de 27 millones de citas de literatura biomédica desde MEDLINE, publicaciones científicas del área de las ciencias de la vida y libros. Al ingresar al motor de búsqueda de PubMed las palabras clave: “positron annihilation lifetime spectroscopy”, aparecen 223 publicaciones que responden al criterio de búsqueda. Según los registros del sitio, las publicaciones sobre aplicaciones PALS en sistemas biomédicos ha mostrado un fuerte incremento a lo largo de los años, alcanzando

su máximo en 2016, con 32 publicaciones anuales.



**Figura 1: Histograma comparativo del número de publicaciones PALS en sistemas de interés en biomedicina por año.**

Un análisis de los sistemas abordados en las mencionadas publicaciones revela que la mayoría yacen en el campo de los estudios poliméricos [13, 17], de nanocompositos [15, 16], de transiciones de fase [14] y de sistemas biomiméticos autoensamblados [18]. En general se observa que el foco de interés de la aplicación de la técnica PALS en estos sistemas esté puesto en la componente de vida media larga  $\tau_3$ , a través de la cual se obtiene información sobre las cavidades nanométricas de las muestras.

En lo que concierne al estudio de tejidos humanos y animales, se han reportado unos pocos trabajos [7-11], cuyos resultados se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1: Parámetros de aniquilación de o-Ps reportados para distintos tejidos biológicos.**

Sistema	$\tau_3$ (ps)	$I_3$ (%)	Referencia
Útero de ratón (*)			
1- normal	2927 (30)	6,5 (3)	7
2- tumoral	2695- 1841 (20)	7,7- 10,1 (1)	
Piel humana (*)			
1- normal	2400 (1)	22 (1)	8



<b>2- tumoral</b>	2200- 2300 (1)	13- 10 (1)	
<b>Piel humana (*)</b> <b>1- normal</b> <b>2- tumoral</b>	2043- 2081 (8) 1951- 2026 (5)	14,16- 14,65 (10) 13,59- 13,70 (14)	9
<b>Cerebro (rata) (*)</b> <b>1- normal</b> <b>2- tumoral</b>	2070 (17) 2040 (14)	no reporta	10
<b>Células de adenocarcinoma de colon en cultivo</b> <b>1- medio de cultivo normal</b> <b>2- medio de cultivo suplementado</b>	1950- 2060 (3) 1970- 2150 (3)	no reporta	11

(\*) *Datos extraídos del Trabajo de Tesis Doctoral “Estudio de sistemas de interés en biología mediante radiaciones nucleares” [19].*

### 1.3. Limitaciones y dificultades de las medidas PALS en Tejidos Biológicos.

Los tejidos biológicos están compuestos por unidades denominadas células que son las entidades estructurales y funcionales más pequeñas que poseen características vitales de un tejido específico. Sus componentes químicos están representados por sustancias y macromoléculas esenciales para el desarrollo de cualquier organismo vivo. Si bien las células tienen características particulares asociadas a los tejidos, órganos y estructura del sistema al que pertenecen, están formadas de manera general por 75 a 85 % de agua, 10 a 20 % de proteínas, 2 a 3 % de lípidos, 1% de glúcidos y 1 % de materia orgánica. El tamaño promedio de la mayoría de las células varía de 10 a 50  $\mu\text{m}$ .

Los tejidos biológicos son conglomerados de células semejantes que poseen las mismas funciones características; estructuradas de forma específica en cada uno de ellos y separadas entre sí por una matriz extracelular. Esta última es producida por las células y está compuesta por un entramado constituido de proteínas y glúcidos embebidos en agua, sales minerales y otras sustancias de bajo peso molecular en distintas concentraciones según el tejido al que pertenezcan. A su vez, distintos tejidos (dos o más) se asocian uno con el otro para formar estructuras más complejas, de mayor tamaño y con funciones determinadas, denominadas órganos.

En base a lo antedicho, resulta evidente que la utilización de tejidos biológicos como muestras PALS así como el análisis de los resultados obtenidos supondrán una dificultad adicional a la que implica el estudio PALS de materiales condensados más homogéneos:

1- la manipulación, preparación y montaje de la muestra alterará en distinto grado la naturaleza del tejido biológico estudiado y esa disrupción debe ser tenida en cuenta al analizar los resultados PALS. En los trabajos PALS en tejidos biológicos pocas veces se reporta el pretratamiento de la muestra y en general no se discute la influencia de dicho factor en los resultados obtenidos.

2- la complejidad física y química de los tejidos biológicos resulta un desafío a la hora de caracterizarlos de manera absoluta mediante cualquier técnica experimental, en particular mediante PALS. Sin embargo, en la literatura que versa sobre el tema se reportan resultados que no se ponen en el contexto de la naturaleza de las muestras analizadas, limitando el alcance de las conclusiones extraídas y muchas veces conduciendo a conclusiones erróneas.

## Capítulo 2. Objetivos

El presente trabajo de diploma tiene como objetivo general investigar el alcance de la Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de Medición de Vidas Medias para proveer información contundente y precisa, cuando es aplicada en el estudio y caracterización de muestras biológicas.

Con ese fin se plantean los siguientes objetivos particulares:

1- Avanzar en la puesta a punto de la obtención, preparación y conservación de tejidos biológicos murinos, poniendo especial atención en el grado de humedad de las muestras al momento de la medida PALS.

Debido a la complejidad de este tipo de sistemas resulta de interés fijar como punto de partida un entorno común a todas las muestras y conocer bajo qué condiciones se desarrollará el estudio PALS. Asimismo, esto facilitará la resolución de problemas relacionados con la protección radiológica, como la pérdida de material radiactivo y la contaminación de las muestras utilizadas.

2- Realizar estudios PALS para determinar los parámetros de aniquilación de positrones en tejidos biológicos de distinta naturaleza y con distinto grado de humedad.

3- Realizar un análisis estadístico de los parámetros de aniquilación obtenidos y del grado de humedad de cada muestra.

Este análisis permitirá develar de forma cualitativa y cuantitativa la información y correlaciones que poseen las medidas experimentales con otras variables de interés.

4- Analizar si la información obtenida mediante medidas PALS de tejidos biológicos puede vincularse a las particularidades de cada muestra.

De esta manera se pretende discriminar con precisión lo que se puede y no concluir a partir de los datos adquiridos.

## Capítulo 3. Materiales y metodología

### 3.1. Obtención, Conservación y Preparación de las Muestras a Estudiar.

En el presente trabajo se utilizaron roedores que fueron anestesiados y sacrificados para su posterior disección y extracción de órganos. Los órganos fueron tomados como muestras biológicas para su estudio mediante la técnica PALS.

En esta sección desarrollaremos una breve reseña de los especímenes utilizados, la obtención de las muestras a estudiar, la conservación y el tratamiento que se les ha dado a las mismas, previo a su medición.



**Figura 2: Ratas Wistar utilizadas en este trabajo.**

#### 3.1.1 Roedores Utilizados.

Los roedores utilizados pertenecen al género *Rattus*, especie *Norvegicus* de la familia de los Muridae, un tipo de línea albina de la rata parda común en las investigaciones biomédicas. Se trata de una especie desarrollada en el Wistar Institute<sup>1</sup> en 1906 para fines de investigación biomédica que fue la primera rata empleada como organismo modelo.

---

<sup>1</sup> El Instituto Wistar es un líder internacional en ciencias biomédicas, con experiencia especial en oncología, inmunología, enfermedades infecciosas y la investigación de vacunas.

Estos animales son dóciles y fáciles de manipular.

Debido a sus características histológicas y anatómicas es una especie empleada comúnmente como animal de laboratorio en investigación y experimentación en biomedicina, toxicología, pruebas de laboratorio y disección. Además, este tipo de rata presenta una anatomía interna en la que se pueden apreciar perfectamente órganos semejantes a los de la especie humana, tal es el caso del corazón, los pulmones, el estómago, la lengua, el hígado, el páncreas, los intestinos (delgado y grueso), los riñones, la vejiga urinaria, los ovarios y/o los testículos. En la Figura 2 se muestra una imagen de los roedores utilizados en este trabajo.

### 3.1.2. Obtención de Muestras

Las muestras fueron obtenidas en el Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)<sup>2</sup> a partir de la disección de 10 ejemplares de Ratas Wistar, normales, sin tratamientos específicos, ni inducción de ninguna patología particular.

Con el objetivo de evitar su sufrimiento, las ratas fueron anestesiadas. El procedimiento consistió en colocar a los roedores dentro de un recipiente (Figura 3) que contenía trozos de algodón embebidos en ISOFLURANE USP, piramal healthcare UK limited, cuya sustancia activa es el isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter), un éter halogenado usado como anestésico inhalatorio<sup>3</sup>. Una vez sedado, el roedor es colocado boca abajo sobre una tabla de madera rectangular, de unos 22 cm de largo por 15 cm de ancho a fin de proceder a su sacrificio<sup>4</sup>.

La extracción de los órganos del animal (disección) se realizó sobre el cuerpo fijado, por

---

<sup>2</sup> El Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA), Fac. de Ciencias Médicas-UNLP, se creó el 27 de septiembre de 1977 mediante acuerdo entre el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y la Universidad Nacional de La Plata.

<sup>3</sup> El isoflurano es usado con frecuencia en cirugía veterinaria. Su fórmula química es  $C_3H_2ClF_5O$ . Más del 99% del isoflurano administrado se elimina inalterable por los pulmones. A la vez, este anestésico volátil no pareciera ser mutágeno, teratógeno o carcinógeno. Una gran ventaja del isoflurano es que la patente que cubre su uso ha expirado, por lo tanto su uso es muy económico.

<sup>4</sup> Una vez ubicado el animal en la tabla, se sitúa el pulgar e índice izquierdos a cada lado del cuello junto a la base del cráneo o, de modo alternativo, se presiona una varilla junto a la base del cráneo. en la zona posterior del cuello. En ese momento con la mano derecha, se tira rápidamente de la base de la cola produciendo el desplazamiento entre las vértebras cervicales y el cráneo, y la muerte definitiva del animal.

sus extremidades superiores e inferiores, a la tabla, de manera que su plano anterior quede ubicado hacia el frente. Se realizó una incisión en su porción media anterior, desde la zona pélvica hasta la parte superior media del esternón finalizando el corte en el sector inferior medio del cuello. Mediante este proceso fueron debidamente extraídos los órganos ubicados en las cavidades abdominal y torácica que utilizamos como muestras del presente trabajo: hígado, riñones, pulmones, corazón. A fin de diseccionar el cerebro, el roedor se rotó 180 grados de manera de ubicarlo con su plano posterior hacia el frente. Se rasuró la zona occipital del cráneo y mediante una incisión a los laterales del agujero magno, a la altura de la unión entre los huesos temporal y occipital, sobre la sutura occipito-mastoidea, se ingresó a la cavidad craneana. El corte se unificó a la altura superior media del hueso frontal y de esta manera se retiró la tapa superior de la bóveda craneal accediendo y retirando de esta manera el encéfalo (representado mayoritariamente por los hemisferios cerebrales).

De esta forma se obtuvieron las muestras correspondientes a 10 roedores, extrayendo el hígado, los riñones, los pulmones, el corazón y el encéfalo por cada uno de ellos.



***Figura 3: Rata en proceso de anestesiado total.***

### 3.1.3. Método de Conservación y Preparación de Muestras.

Cada una de las vísceras, una vez retiradas, fueron conservadas en tubos falcon conteniendo alcohol etílico al 70%, para preservar la estructura original de los órganos, desinfectar y esterilizar las muestras. Los órganos así dispuestos fueron refrigerados a cuatro grados Celsius hasta el momento de su medida<sup>4</sup>.

La elección de etanol 70 % como medio para preservar los tejidos biológicos responde a sus propiedades como antiséptico y desinfectante, además de su actividad como conservador de la estructura de los tejidos orgánicos<sup>5</sup>.

Previo a la realización de las mediciones PALS, cada órgano fue fraccionado en porciones de igual tamaño y secado para su evaluación, eliminando de esta forma el alcohol y una fracción del agua de la muestra. El propósito de este secado es impedir que la fuente radioactiva utilizada ( $^{22}\text{Na}$ - NaCl) se disuelva al contacto con las muestras y la subsecuente pérdida de actividad de la fuente y contaminación de las muestras biológicas. Asimismo, la humedad de los tejidos puede provocar que al secarse en contacto con la fuente radiactiva, la muestra se adhiera al kapton que la recubre resultando en la inevitable ruptura de la fuente de positrones.

Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente en un desecador conteniendo sílica gel (sustancia inerte y de alto poder higroscópico, muy utilizada como desecante). El procedimiento consistió en colocarlas las porciones de los órganos en cápsulas de Petri sobre una base horizontal agujereada y luego aisladas mediante el cerramiento hermético del dispositivo desecador. Esto permite que los tejidos no queden en contacto íntimo con

---

<sup>5</sup> El mecanismo de acción del etanol como bactericida es la desnaturalización de las proteínas de los microorganismos. Esta desnaturalización proteica sólo es posible en presencia de agua debido a las presiones osmóticas involucradas en estos procesos; por este motivo el alcohol absoluto (etanol 100 %) presenta un poder bactericida mucho menor que las mezclas de alcoholes con agua. La solución de etanol al 70 %, posee además cierta acción bacteriostática al inhibir la producción de metabolitos esenciales para la división celular rápida. A pesar de que existen varias concentraciones de etanol, la más efectiva es la del 70 % ya que su penetración en el protoplasma bacteriano es superior a la de las otras soluciones alcohólicas. El alcohol al 70% puede eliminar al 90% de las bacterias a pocos minutos de ponerse en contacto con las muestras biológicas.

el entorno ni con el desecante, posibilitando la comunicación sólo con el ambiente en el que se encuentran posicionadas las muestras. De esta manera el gel de sílice absorbe el agua de ambiente encerrado y, por consiguiente, va extrayendo el contenido acuoso ubicado en el interior del material biológico.

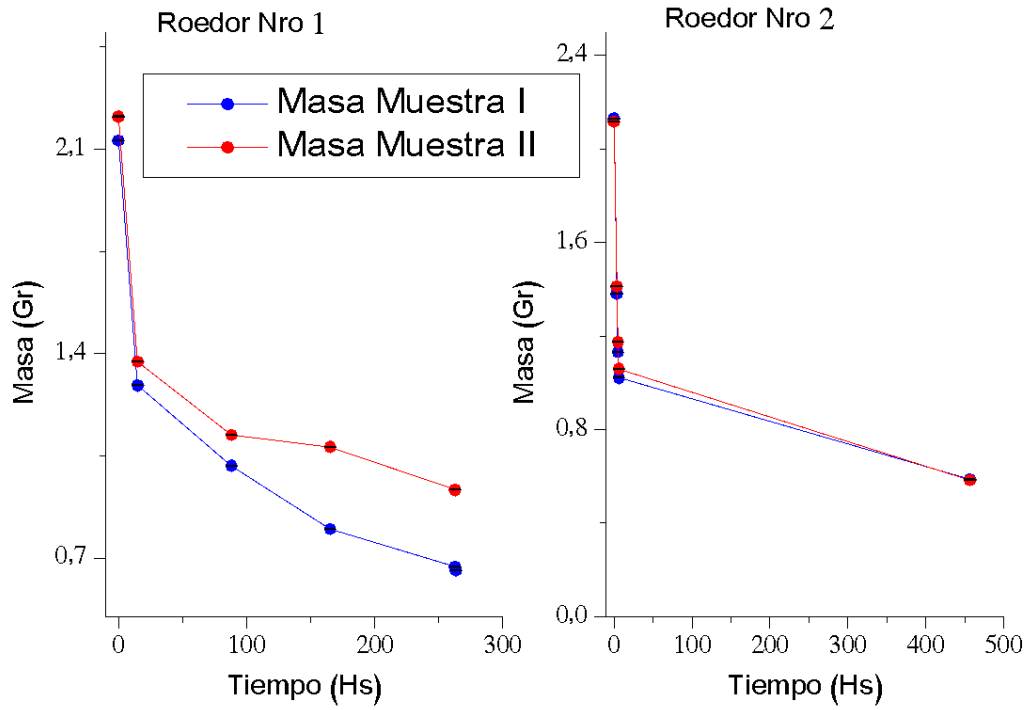


**Figura 4: Desecador con muestras de hígado en su interior.**

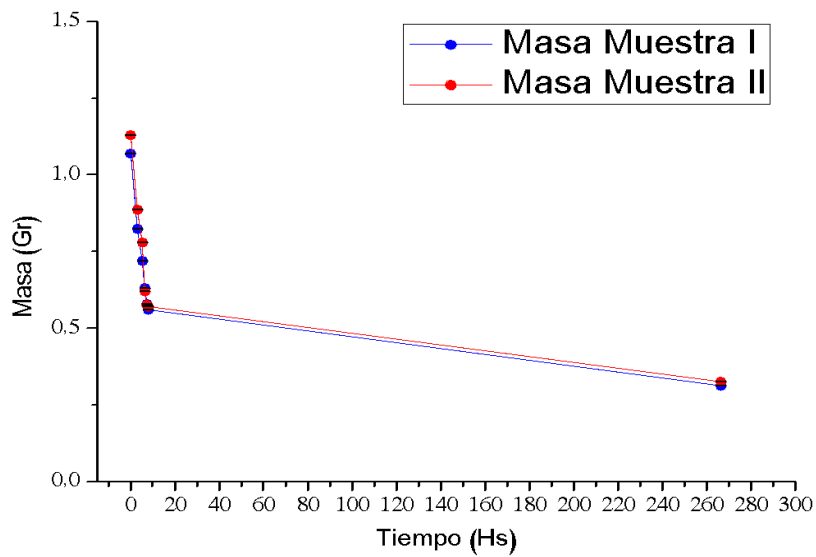
Para el seguimiento del secado se midió la pérdida de masa de las muestras en una balanza analítica (OHAUS PA-214, 0.1mg de resolución), a distintos intervalos de tiempo, tomando como  $t=0$  el momento en el cual se extrae el órgano de la solución de etanol al 70 %.

En las Figuras 5 a 9 se muestran los valores de masa de muestra obtenidos en función del tiempo de secado de los distintos órganos (hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebro respectivamente). Esto proporciona un estudio de la progresión temporal de la pérdida de masa de los tejidos conforme sufren deshidratación en el desecador.

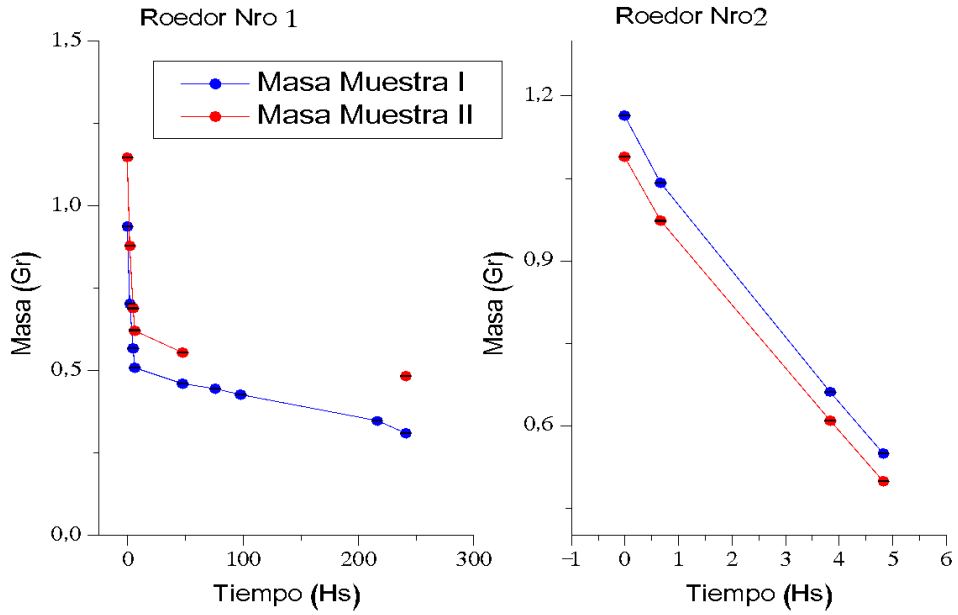




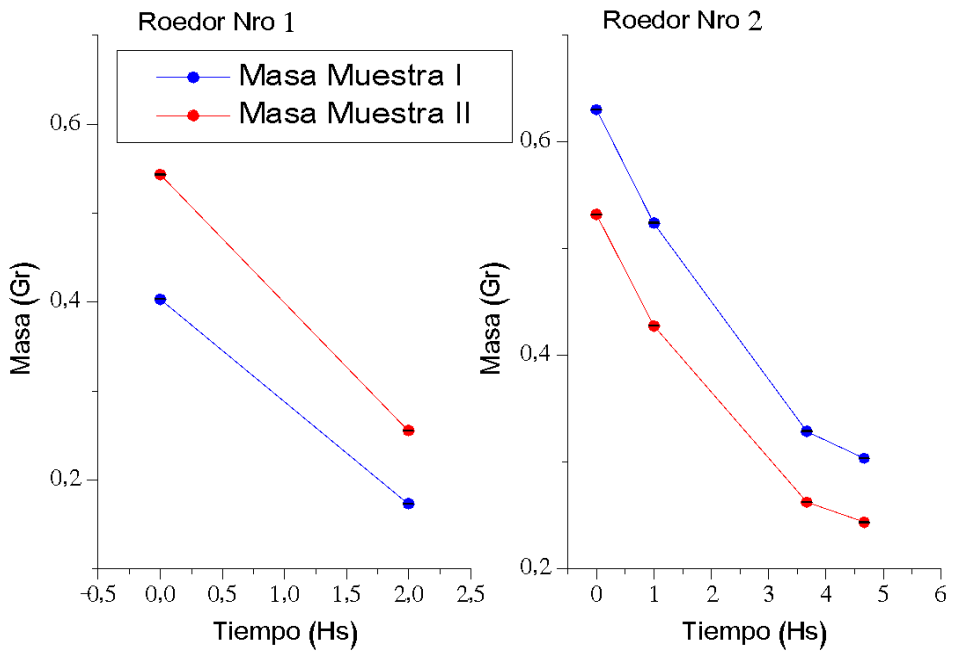
**Figura 5: Secado de Hígado, masa en función del tiempo.**



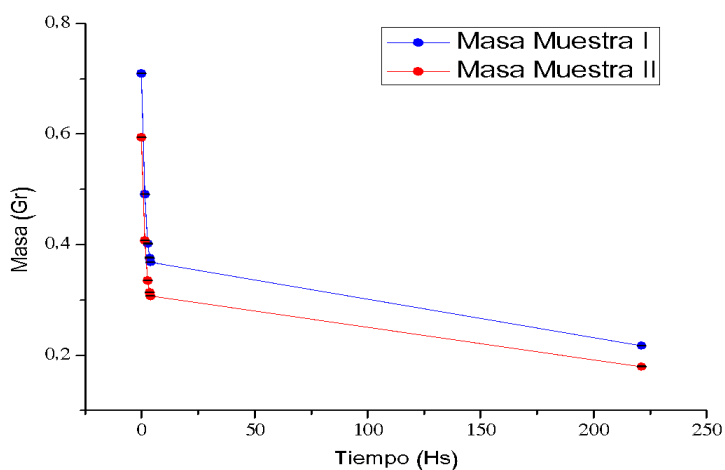
**Figura 6: Secado de Riñón, masa en función del tiempo.**



**Figura 7: Secado de Pulmón, masa en función del tiempo.**



**Figura 8: Secado de Corazón, masa en función del tiempo.**



**Figura 9: Secado de Cerebro, masa en función del tiempo.**

Los gráficos de secado muestran en todos los casos que la pérdida de masa debido a la extracción de agua es mayor a mayor tiempo transcurrido, mostrando las curvas masa *versus* tiempo un comportamiento asintótico; evidenciando que la tasa de pérdida de masa va disminuyendo a medida que extraemos mayor cantidad de agua.

El análisis de las curvas de secado para los distintos órganos evidencia que la tasa de secado es distinta según la muestra que se considere. Así, si las curvas correspondientes a hígado y riñón revelan que el primero, en las primeras tres horas de secado, pierde entre el 33% y el 35% de su peso en agua, mientras que el riñón, en el mismo periodo, pierde entre un 21% y un 23%. Las diferencias de grado de secado para cada órgano pueden atribuirse a características particulares de la víscera considerada (estructura interna, conformación histológica, densidad, grado de hidratación y porcentaje de alcohol que incorpora), de las porciones de muestra secadas (volumen, superficie expuesta al aire y conformación espacial característica) y de las condiciones de secado (grado de hidratación del gel, humedad ambiente) lo cual explica el hecho de que el mismo órgano proveniente de animales diferentes presente distintos perfiles de secado (Figuras 5, 7 y 8).

En la Tabla 2 se presenta el porcentaje de agua perdida por cada órgano en función del tiempo de secado hasta el momento en que se pone cada muestra a medir. Es importante notar que la pérdida de agua continúa luego de retirar las muestras del desecador,

mientras procede la medida PALS, tal como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 2: Porcentaje de agua perdida por cada tejido en función del tiempo de secado hasta el momento en que se pone cada muestra a medir.**

Tiempo (h)	Cerebro	Corazón Roedor 1	Corazón Roedor 2	Pulmón Roedor 1	Pulmón Roedor 2	Hígado Roedor 1	Hígado Roedor 2	Riñón
0	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
1			18,30 %		10,85 %			
2	32,50 %							
3		55,00 %		24,20 %			34,20 %	22,15 %
4	48,15 %		49,50 %		43,90 %			
5			53,15 %	39,50 %	53,60 %		45,70 %	32,00 %
6				45,70 %			51,00 %	43,10 %
7								50,25 %
15						38,60 %		

**Tabla 3: Porcentaje de agua perdida por cada tejido en función del tiempo de secado hasta el momento en que se finalizó cada medida.**

Tiempo (días)	Cerebro	Pulmón Roedor 1	Hígado Roedor 1	Hígado Roedor 2	Riñón
8	69,78 %				
10		62,40 %			
11			63,42 %		76,75 %
19				72,45 %	

De todas las muestras analizadas, resultaron útiles para las medidas PALS aquellas con una pérdida de masa de agua de entre un 45% a un 60%. Por debajo de 45 % de pérdida de peso se comprobó que las muestras quedan húmedas y son contaminadas por la fuente radiactiva, mientras que por encima del 60 % de pérdida de masa por secado las muestras alcanzan un estado de rigidez tal que se hace imposible manipularlas y posicionarlas en el dispositivo de medida.

### **3.2. Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en Modo de Medición de Vidas Medias.**

La Espectroscopía de Aniquilación de Positrones en el modo de Medición de Vidas Medias es una técnica no destructiva, altamente sensible para caracterizar volúmenes libres dentro de un material, que brinda información sobre las dimensiones de estas cavidades y su distribución en el medio.

La técnica se basa en que los positrones son las antipartículas de los electrones, de allí que en cualquier material, los positrones encontrarán a los electrones que lo conforman y, luego de un lapso de tiempo determinado, se aniquilarán con alguno de ellos produciendo la emisión de radiación electromagnética. El estudio de dichas emisiones permite analizar la estructura electrónica y posibles defectos en materiales de distinta índole. En el caso del modo PALS las medidas permiten obtener información sobre el tiempo de vida de los positrones que se introducirán dentro de las muestras en estudio.

En esta sección trataremos los fundamentos del método de medida, el desarrollo experimental de la técnica y la información obtenida a partir de los espectros PALS.

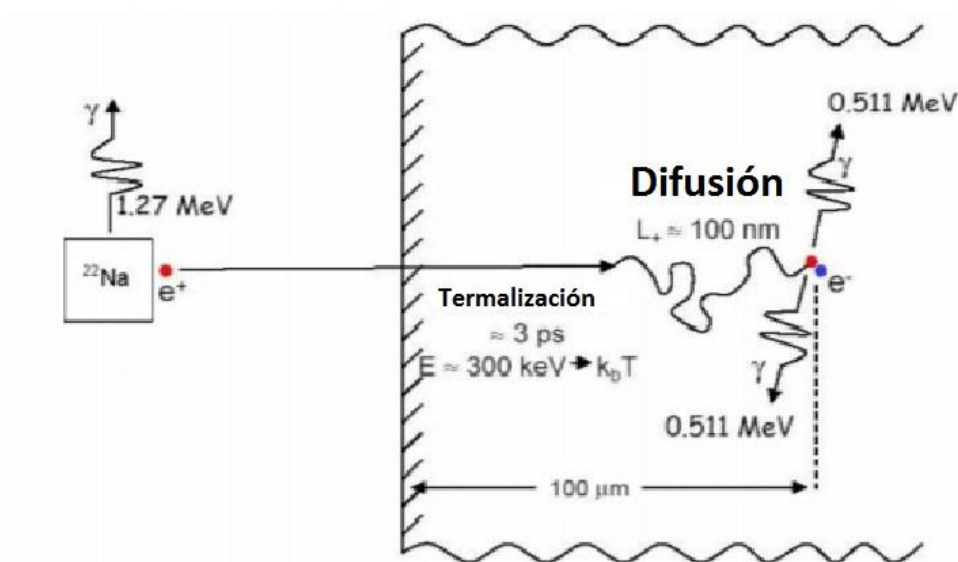
#### **3.2.1. Fundamentos Teóricos.**

El positrón tiene la misma masa, el mismo spin electrónico y la misma carga eléctrica que un electrón, pero esta última es de signo opuesto, es decir, que es de signo positivo. El positrón como partícula fue predicha en el año 1928 por Paul Dirac, y luego fue detectada por primera vez por Carl David Anderson en 1932 al fotografiar el rastro de rayos cósmicos sobre una cámara de niebla.

Los positrones pueden obtenerse a escala de laboratorio mediante la utilización de isótopos radiactivos que presentan desintegración  $\beta^+$ , es decir, emiten positrones al medio para estabilizar sus núcleos. Para realizar las medidas de Espectroscopía de Aniquilación de Positrones utilizamos una fuente radiactiva cuyo isótopo emisor es el  $^{22}\text{Na}$ .

### 3.2.1.1. Interacción de Positrones con la Materia.

Cuando un positrón es eyectado con una cierta energía de una fuente radiactiva y penetra dentro de un material condensado, sufre un proceso denominado termalización, en el que se ve frenado por la interacción con los núcleos y electrones del material en el que se implanta; perdiendo así su energía cinética, hasta alcanzar valores térmicos, del orden de 1 a  $1/40$  eV, en un lapso de tiempo de 1 a 10 ps. En este proceso el rango de penetración del positrón en el medio material es de unos 10 a 1000  $\mu\text{m}$ . Esto dependerá de la energía cinética inicial del positrón y de la densidad electrónica que posea el material con el que interactúa. La Figura 10 muestra un esquema simplificado del proceso de termalización, difusión y aniquilación de un positrón emitido por una fuente de  $^{22}\text{Na}$ .

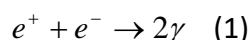


**Figura 10: Esquema simplificado del proceso de termalización, difusión, atrapamiento y aniquilación de un positrón emitido por una fuente de  $^{22}\text{Na}$ .**

El positrón termalizado puede mantenerse en equilibrio térmico con el medio y difundir dentro del material hasta su definitiva aniquilación con un electrón. El tiempo de vida de cada positrón está caracterizado por la densidad electrónica que posea cada material con el que interactúa y puede variar entre 100 y 500 ps. Sin embargo, como discutiremos más

adelante, la vida media puede alcanzar valores del orden de algunos ns si se forma un sistema enlazado que involucra a un electrón y a un positrón, denominado positronio.

Si bien existen varios procesos por los que un positrón puede aniquilarse con un electrón, el principal es el que sucede mediante la producción de dos rayos gamma de 511 keV (equivalente energético de la masa en reposo de cada partícula) cada uno sobre la misma dirección, pero en sentidos diametralmente opuestos. La ecuación que define, de forma general, esta transformación es:



Donde  $e^+$  y  $e^-$  se refieren a las masas del positrón y del electrón respectivamente y  $\gamma$  es la emisión electromagnética correspondiente.

### 3.2.1.2. Termalización y Difusión de Positrones.

Como fue mencionado anteriormente, cuando un positrón, proveniente de una fuente radiactiva, es inyectado en un medio material con una determinada energía cinética se va frenando al interactuar con la estructura atómica del medio. Este proceso ocurre en dos etapas bien diferenciadas, cada una de ellas con una tasa de pérdida de energía particular [20]. Para valores de energía del positrón desde unos cientos de keV (energías con los que son emitidos los positrones por la fuente) hasta aproximadamente 1 eV, la disminución de energía se asocia a la ionización y excitación de los electrones del material; y para energías de 1 eV hasta unos 0,025 eV, energías del orden del equilibrio térmico, el frenado ocurre casi exclusivamente por las interacciones fonón-positrón.

El rango de implantación de los positrones en un material biológico es de unos 10 a 1000  $\mu\text{m}$  lo que permite sondear el volumen de la muestra. Esta implantación, que fue medida para diversos materiales en 1977 por Paulin y Brandt [21] tiene un perfil exponencial de la forma:

$$P(x) = P(0)e^{-\alpha x} \quad (2)$$

Donde  $x$  es la profundidad de penetración que alcanza el positrón,  $\alpha$  es un coeficiente de absorción y  $P(0)$  es la densidad inicial de positrones emitidos por la fuente. Sin embargo, es sabido que las partículas ligeras, tales como los positrones, experimentan colisiones elásticas, inelásticas y radiactivas (bremsstrahlung) dentro de un material que depende, entre otros factores, de la energía con la que son emitidos. Como estas partículas poseen una masa extremadamente pequeña, dichas colisiones provocan una gran desviación en su trayectoria y, por lo tanto, experimentan un movimiento de tipo browniano dentro del material. El camino libre medio, que es la profundidad de penetración de una partícula en un determinado material, se define como el recorrido total de la partícula en forma rectilínea dentro del medio bajo estudio. Por tanto, la penetración máxima de un positrón de alta energía en un material determinado es su camino libre medio y es del orden del milímetro. Si bien dicho valor es aproximado resulta de suma importancia como parámetro a tener en cuenta para la preparación de las muestras a medir mediante la Espectroscopia de Vidas Medias de Positrones: si la muestra es muy delgada existe el riesgo de que las partículas se escapen del material y se aniquilen en el aire.

En el momento en que los positrones alcanzan el equilibrio térmico con el medio (que se mantiene gracias a la emisión y absorción de fonones) tiene lugar el proceso de difusión. Durante éste, el positrón interactúa con los alrededores y se aniquila con un electrón. Los positrones con energías del orden de  $kT$  (energías del orden térmico, donde  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura absoluta) están deslocalizados dentro de la red del medio con el que interactúan y su movimiento es bien descrito mediante la teoría de difusión. Se ha aplicado el formalismo matemático que proporciona la teoría semiclásica del caminante aleatorio, usando los valores propios para el coeficiente de difusión de una partícula cargada, y se han obtenido valores de camino libre medio de entre 50 y 100 nm. Estos valores permiten asimismo calcular la distancia recorrida dentro del material en el tiempo de vida del positrón, que resulta ser del orden del rango de implantación, o penetración, en materiales condensados.



### 3.2.1.3. Procesos de Aniquilación de Positrones en un Material.

Ya hemos mencionado que un positrón térmico y un electrón del medio se aniquilarán con mayor probabilidad mediante un proceso en el que resulta la emisión de dos rayos gamma, cuya sección eficaz puede expresarse de la siguiente forma:

$$\sigma = \frac{\pi r_0^2}{\gamma+1} \left[ \frac{\gamma^2+4\gamma+1}{\gamma^2-1} \ln(\gamma + \sqrt{\gamma^2-1}) - \frac{\gamma+3}{\sqrt{\gamma^2-1}} \right] \quad (3)$$

Donde  $\gamma = \frac{1}{\sqrt{1-(v/c)^2}}$  y  $r_0$  es el radio clásico de un electrón [22].

Los positrones provenientes de la fuente experimentan el proceso de aniquilación casi en reposo y, por lo tanto, estaremos en el límite donde  $(v/c) \ll 1$ , de esta manera la ecuación de la sección eficaz tomará la forma:

$$\sigma = \pi r_0^2 (v/c) \quad (4)$$

Donde  $c$  es la velocidad de la luz y  $v$  la velocidad del positrón.

El producto entre la sección eficaz, la velocidad del positrón y la densidad electrónica del material en el sitio se define como la tasa de aniquilación del sistema y, por lo tanto, es independiente de la velocidad del positrón:

$$\lambda_e = \pi r_0^2 c \delta_e \quad (5)$$

En esta ecuación  $\delta_e$  representa la densidad de electrones en el sitio de aniquilación y se puede expresar como:

$$\delta_e = \int \rho_-(\mathbf{r}) \rho_+(\mathbf{r}) g d\mathbf{r} \quad (6)$$

Aquí  $\rho_-$  es la densidad de electrones del sitio y  $\rho_+ = |\Psi^+(\mathbf{r})|^2$  es la densidad positrónica en el mismo lugar. El factor de corrección  $g$  expresa el aumento en la densidad electrónica debido al apantallamiento coulombiano que soportan los positrones.

La tasa de aniquilación positrónica es la inversa de la vida media de los positrones y, finalmente, obtenemos una expresión que relaciona a esta variable con la densidad electrónica del medio [23]:

$$\lambda_e = \frac{1}{\tau} = \pi r_0^2 c \int \rho_-(\mathbf{r}) |\Psi^+(\mathbf{r})|^2 g d\mathbf{r} \quad (7)$$

En materiales no conductores, como los que utilizamos en este trabajo, existen tres procesos de interacción principales por medio de los cuales un positrón puede aniquilarse. Cada uno de ellos depende de las características estructurales y moleculares propias del material y, por consiguiente, sucederán con distinta probabilidad. Además, cada proceso está determinado por un estado y un rango de vida media típico, que depende de la densidad electrónica y el tamaño de los defectos internos del material (Tabla 4).

Así, un positrón termalizado puede aniquilarse con electrones libres del medio en un proceso cuya vida media es la más corta e involucra sólo a estas dos partículas. Por otro lado, el positrón puede quedar atrapado en defectos internos del material donde la densidad electrónica se encuentra reducida, por esta razón su tiempo de vida se ve aumentado; aquí también participan las dos partículas involucradas en la aniquilación y el modelo para describir este fenómeno se denomina “Modelo de Atrapamiento” o “Modelo de Trampas”. Finalmente, existe una probabilidad de que se forme un estado enlazado entre un positrón y un electrón, llamado orto-positronio, que quedará atrapado en volúmenes libres de mayor tamaño dentro del materia y cuyo proceso de aniquilación involucra una tercera partícula: un electrón de los alrededores al sitio donde se encuentra atrapado el positronio.

#### 3.2.1.4. Modelo de Atrapamiento.

Como se ha comentado un positrón tiene una cierta probabilidad de quedar atrapado en pequeños defectos donde la densidad electrónica del medio está reducida. Este fenómeno sucede en zonas cuya energía de ligadura es del orden de unos pocos eV. De esta manera, si un positrón es atrapado en este tipo de vacancias no podrá escapar y se aniquilará dentro del defecto. La partícula atrapada en un defecto de estas características se encuentra con una densidad electrónica menor dentro de la red estructural del medio y, debido a esto, la vida media del positrón aumenta. El modelo para describir este proceso de interacción se conoce comúnmente como Modelo de Atrapamiento, o Modelo de Trampas [24].

Con el fin de describir brevemente dicho modelo, se utilizará una simplificación que permitirá comprender de forma concreta el fenómeno de aniquilación bajo este proceso. Para ello se supondrá que una vez atrapado, el positrón no puede escaparse del defecto y que, dentro del material, existen un sólo tipo de estos últimos. Estas consideraciones teóricas permiten hablar de un modelo simple de dos estados que es el más utilizado para comprender el proceso de atrapamiento de positrones dentro de la materia condensada. El Modelo de Atrapamiento propone que, para un instante de tiempo  $t$ , el número de positrones deslocalizados dentro del material,  $n_b(t)$ , o atrapados dentro de un defecto  $n_d(t)$ , están dados mediante dos simples relaciones diferenciales:

$$\frac{dn_b(t)}{dt} = -\lambda_b n_b - \kappa n_b \quad \text{y} \quad \frac{dn_d(t)}{dt} = \kappa n_d - \lambda_d n_d \quad (8)$$

Aquí  $\lambda_b$  y  $\lambda_d$  describen las tasas de aniquilación dentro del material debido a los positrones libres y atrapados en defectos respectivamente. La magnitud  $\kappa$  es la tasa de atrapamiento que depende directamente de la concentración de vacancias que posee el medio y de la tasa de atrapamiento específica de cada defecto particular.

Por lo tanto, si se supone que en el estado inicial, cuando el positrón ingresa al medio, se encuentra en estado libre deslocalizado entonces  $n_b(0)=1$  y  $n_d(0)=0$ . A partir de aquí resolvemos las ecuaciones diferenciales (8), cuyas soluciones son de la forma:

$$n_b(t) = e^{-(\lambda_b + \kappa)t} \quad \gamma \quad n_d(t) = \frac{\kappa}{\lambda_b - \lambda_d + \kappa} [e^{-\lambda_d t} - e^{-(\lambda_b + \kappa)t}] \quad (9)$$

De esta manera el número de positrones que no se han aniquilado es  $n(t) = n_b(t) + n_d(t)$  que de forma general es una suma discreta de decaimientos exponenciales  $n(t) = I_1 e^{-\lambda_1 t} + I_2 e^{-\lambda_2 t}$ . Si comparamos término a término con las ecuaciones (9) obtenemos las expresiones para las intensidades  $I_1$  e  $I_2$  y para las vidas medias correspondientes:

$$I_1 = 1 - \frac{\kappa}{\lambda_b - \lambda_d + \kappa} \quad \gamma \quad I_2 = 1 - I_1 = \frac{\kappa}{\lambda_b - \lambda_d + \kappa}$$

$$\lambda_1 = \frac{1}{\tau_1} = \lambda_b + \kappa \quad \gamma \quad \lambda_2 = \frac{1}{\tau_2} = \lambda_d \quad (10)$$

De esta manera la porción de positrones que se aniquilan en un determinado tiempo  $t$  estará dada por  $1 - n(t)$ .

Es importante considerar que en materiales biológicos los defectos pueden ser de distintos tipos y formas. Además, la probabilidad de escape de los positrones atrapados no siempre resulta ser nula. Asimismo, este modelo sólo describe los procesos de aniquilación en los que participan dos partículas, es decir, que no tiene en cuenta la formación y aniquilación del positronio.

### 3.2.1.5. Formación de Positronio.

En materiales no conductores, como es el caso de las muestras biológicas con las que trabajaremos, los positrones tienen una probabilidad de interactuar con un electrón formando un estado ligado entre ambas partículas, semejante a un átomo de hidrógeno, denominado positronio (ver Figura 11). Debido a que el electrón y el positrón poseen la misma masa, ambas partículas rotan con la misma velocidad alrededor de su centro de masa separadas entre sí una distancia de  $1,06 \text{ \AA}$ .

En la formación del positronio coexisten dos configuraciones, diferenciadas por la orientación del espín característico de las partículas involucradas. La primera configuración aparece si el espín del electrón y del positrón se disponen de forma

paralela: se trata del estado triplete ( $S=1$ ,  $M_s=-1, 0, 1$ ) llamado orto-positronio (o-Ps). En la otra configuración los espines se disponen de manera antiparalela entre sí, resultando un estado singlete ( $S=0$ ,  $M_s=0$ ) denominado para-positronio (p-Ps). La proporción en la formación de o-Ps y p-Ps es de 3:1.

Los valores de las vidas medias de autoaniquilación son particulares de cada estado siendo  $\tau_{p-Ps} = 125 \text{ ps}$ , para el para-positronio, y  $\tau_{o-Ps} = 142 \text{ ns}$ , para el orto-positronio. Dentro de un material no será posible observar la vida media del o-Ps, debido a que se ve fuertemente reducida a valores de algunos ns o menos. Esto sucede debido a que el positrón no se aniquila con el electrón al que está ligado, sino que lo hace con un electrón, de espín opuesto, del material circundante. El proceso por el que ocurre este efecto se conoce como *pick-off*.



**Figura 11: Esquema simplificado de un átomo de hidrógeno y un positronio.**

Existen otros dos procesos en el que la vida media del o-Ps se ve reducida. En primer lugar, si el espín de alguna de las partículas ligadas cambia su orientación respecto de la otra, el o-Ps se convierte en p-Ps y se aniquila rápidamente. Este efecto se produce con mayor probabilidad en presencia de especies paramagnéticas dentro de la red material. Por otro lado, al igual que otros átomos, el o-Ps puede intervenir en reacciones químicas tales como su oxidación a positrón libre o combinarse con otros átomos para formar compuestos. En esta última situación se dice que el orto-positronio se encuentra *quencheado*.

Sin embargo, el o-Ps tiene una probabilidad de quedar atrapado en defectos del tipo

vacancia dentro de un material no conductor. La energía de ligadura de este estado es de algunos eV, por ende el positrón quedará atrapado en el defecto y se aniquilará dentro del mismo. El positronio atrapado se encuentra en un sitio más amplio dentro del material y, por lo tanto, con menor densidad electrónica; de aquí que el efecto del pick-off se reduce y, por consiguiente, la vida media del o-Ps aumenta.

En la Tabla 4 se presentan las características de los diferentes procesos de aniquilación y las vidas medias del positrón y el positronio, según corresponda.

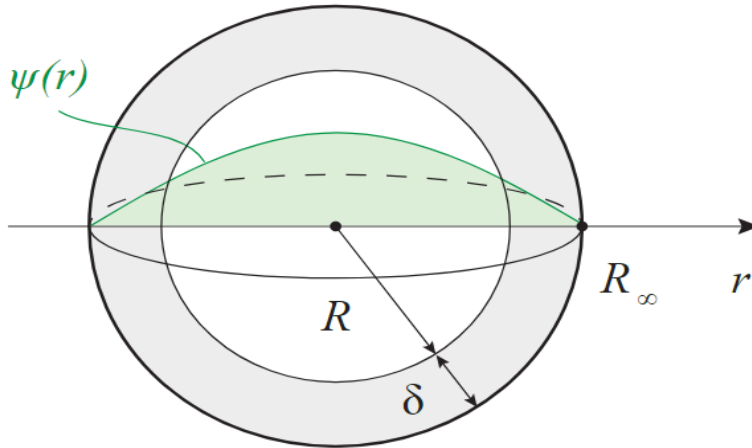
**Tabla 4: Tiempo de vidas medias características de distintos procesos de aniquilación de positrones en la materia.**

Estado	Proceso	Vida Media
Positrón "Libre"	2 $\gamma$	0,1- 0,4 ns
Positrón "Atrapado"	2 $\gamma$	0,2 – 0,5 ns
p-Ps	2 $\gamma$ (Autoaniquilación)	0,125 ns
o-Ps	2 $\gamma$ (Pick-off)	< 3 ns
	3 $\gamma$ (Autoaniquilación)	142 ns

### 3.2.1.6. Información Obtenida a Partir de una Medida PALS.

La deconvolución de los espectros PALS permite inferir información sobre la densidad electrónica y defectos estructurales dentro del material de estudio. Dado que PALS es una técnica extremadamente sensible para caracterizar volúmenes libres locales a escala nanométrica, puede brindar información sobre el tamaño y la distribución de estos volúmenes y, en conjunto con otras caracterizaciones fisicoquímicas, su rol en la dinámica de diversos fenómenos. En esta sección vamos a exponer y analizar la información que nos brinda este modo de trabajo de la Espectroscopía de Aniquilación de Positrones.

Como se ha mencionado, la vida media de los positrones  $\tau$  se relaciona, de acuerdo a la ecuación (7) con la densidad electrónica del medio donde ocurre su aniquilación. Es a partir de esta ecuación que podemos conocer la densidad de electrones del sitio de aniquilación, si se tiene una medida promedio de las vidas medias de los positrones inyectados dentro de la muestra.



**Figura 12: Boceto de cavidad esférica donde se encuentra atrapado el positronio. Donde  $R_\infty$  es el radio de la cavidad,  $R$  radio de la esfera donde se encuentra el positronio y  $\psi(r)$  es la función de onda del positronio atrapado dentro de la cavidad.**

Por otro lado, la vida media de aniquilación del o-Ps en el vacío puede ser utilizada como un sensor del tamaño de las cavidades donde pueden quedar atrapados este sistema de partículas. Sabiendo que la tasa de probabilidad de que suceda un proceso de pick-off depende directamente de las dimensiones de la cavidad donde se encuentra el o-Ps, Tao (1972) y Eldrup (1981) desarrollaron y presentaron una relación semiempírica entre la vida media del o-Ps y el tamaño de la cavidad donde éste se aniquila [25, 26]. El modelo de Tao-Eldrup supone que el orto-positronio se encuentra recluido en una esfera rígida de radio  $R_\infty$ . Para que la aniquilación de pick-off sea posible, se debe permitir la penetración de los electrones de la nube electrónica de los alrededores dentro de la esfera. Esta nube electrónica está separada de la esfera y su frontera presenta un espesor definido por la siguiente ecuación  $\delta = R_\infty - R$ , donde  $R$  es el radio de la esfera donde se encuentra el positronio (Figura 12). Según este modelo, la tasa de aniquilación por el proceso de pick off,  $\lambda_{PO}$ , donde se encuentra el positronio (Figura 12) se relaciona con el radio  $R$  de la cavidad, donde el o-Ps reside y se aniquila, mediante la siguiente ecuación:

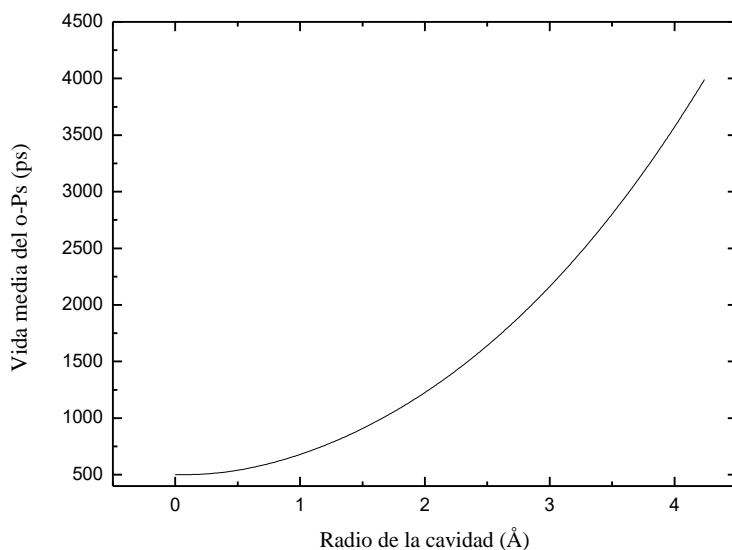
$$\lambda_{PO} = \frac{1}{\tau_{PO}} = 2 \left[ 1 - \frac{R}{R+\delta} + \frac{1}{2\pi} \sin \left( \frac{2\pi R}{R+\delta} \right) \right] \quad (11)$$

Donde  $\tau_{PO}$  es el tiempo de vida media para la aniquilación de pares mediante el proceso de pick-off del o-Ps en la cavidad. El valor de  $\delta$  puede calcularse ajustando las velocidades de aniquilación de pick-off experimentalmente y resulta ser  $\delta = 1,66 \text{ \AA}$ . Teniendo en cuenta esto, podemos reescribir la ecuación anterior de forma de obtener la expresión general que vincula la dimensión promedio de la cavidad donde reside y se aniquila el o-Ps con su vida media característica dentro de ella:

$$\tau = \frac{1}{2} \left[ 1 - \frac{R}{R+\delta} + \frac{1}{2\pi} \sin \left( \frac{2\pi R}{R+\delta} \right) \right]^{-1} \quad (12)$$

El modelo de Tao-Eldrup es de utilidad para el cálculo de volúmenes libres cuyos radios son del orden de 1 nm o menores. En la Figura 13 se muestra la dependencia de la vida media del o-Ps, en ps, y el radio promedio de la cavidad, en  $\text{\AA}$ , según el modelo descrito anteriormente. Existe otro modelo que nos permite extender el cálculo de las dimensiones de cavidades hasta tamaños de decenas de nanómetros, conocido como modelo Tokio [27] o RTE [28].





**Figura 13: Relación entre la vida media del o-Ps y el radio de la cavidad donde se aniquila según el modelo Tao-Eldrup.**

Finalmente, de la probabilidad de que la formación del positronio suceda, se puede obtener información de la estructura física y química del sistema material bajo estudio.

El proceso mediante el cual se forma positronio puede ser descrito por dos modelos: el de Ore y el de Mogensen. A continuación se describirán las principales características de cada uno.

El modelo propuesto por Ore plantea que sólo los positrones con una energía cinética dentro de un intervalo específico podrán formar positronio con un electrón del medio, mientras que los que se encuentran fuera de dicho intervalo estarán inhibidos para hacerlo. Este modelo supone que los positrones van perdiendo energía cinética hasta alcanzar ciertos valores que caen dentro del mencionado intervalo. El límite inferior de ese intervalo se define como  $V-IPs$ , en donde  $V$ , es el potencial de ionización del medio que rodea al positronio e  $IPs$  es el potencial de ionización del positronio, equivalente a 6, 8 eV. En la práctica el proceso de formación del positronio en el intervalo de Ore tiene que competir con todos los demás procesos que causan la moderación de este tipo de partículas hacia energías menores que el límite mínimo de Ore. Los procesos más

importantes son las colisiones elásticas e inelásticas con las moléculas del medio. La energía transferida en los choques inelásticos estimula la rotación y vibración de las moléculas y además conduce a la captura del positrón por el medio que lo rodea.

Por otro lado, el modelo de Mogensen, conocido como el modelo de espuela (traducido del inglés, "spur reaction model"), describe las interacciones que participan en el proceso de termalización. En este modelo se considera que el positrón, a medida que se va termalizando por las colisiones con los componentes del medio, va generando a su paso ionizaciones y excitaciones electrónicas. El positrón pierde sus últimos 100-200 eV en crear un grupo de intermediarios reactivos como electrones, iones, radicales libres y moléculas excitadas: especies se encuentran muy cercanas entre sí con gran probabilidad de reaccionar unas con otras previo a difundir en el material. El positronio resulta de la combinación del positrón con un electrón secundario que él mismo ha expulsado de las moléculas del medio en su trayectoria. Así, la formación de positronio es resultado de la interacción coulombiana entre el positrón y alguno de los electrones dentro de la "espuela" de las especies reactivas que se forman a su paso. La gesta de un positronio compite, en este caso, con otros procesos: recombinación de electrones con iones positivos, difusión de los electrones fuera de las "espuelas" y la interacción que las moléculas del medio ejercen sobre el electrón y el positrón.

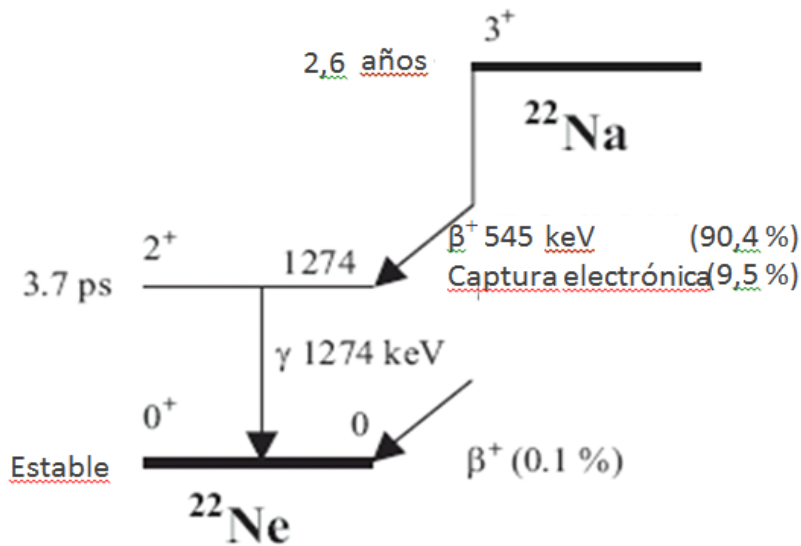
Los materiales biológicos, tales como los que se utilizarán en el presente trabajo, poseen una alta complejidad química ya que están formados por una gran variedad de especies moleculares y macromoleculares, por lo que existe una alta probabilidad de que se forme positronio en su interior.

### 3.2.2. Método Experimental.

En esta sección presentaremos detalles del método experimental, a saber: el equipo utilizado, la fuente de positrones, el montaje de las muestras, la adquisición y el análisis de datos y otras consideraciones de interés para la correcta realización del experimento.

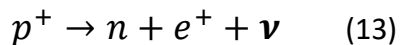
### 3.2.2.1. Fuente de Positrones.

La fuente de positrones utilizada en el presente trabajo es  $^{22}\text{Na}$ - NaCl, que presenta características de emisión adecuadas para realizar medidas PALS. Su esquema de desintegración radiactiva se muestra en la Figura 14.



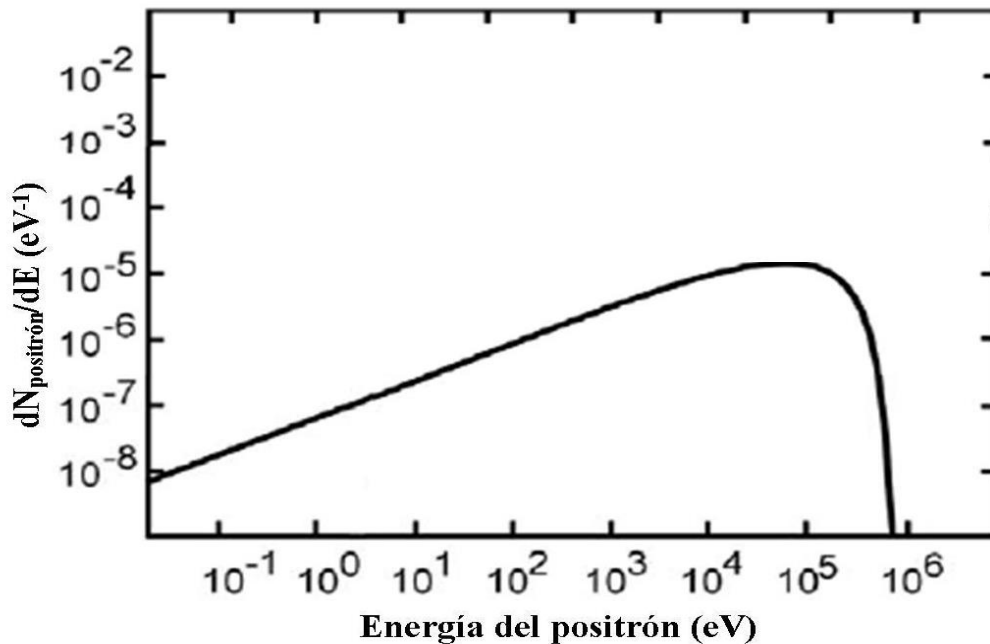
**Figura 14: Esquema de desintegración radiactiva del  $^{22}\text{Na}$ .**

El  $^{22}\text{Na}$  se desintegra emitiendo partículas  $\beta^+$  (positrones) en un  $90,4\%$ , y por captura electrónica un  $9,5\%$ , con un semiperiodo de desintegración de  $2,6$  años. El proceso de desintegración  $\beta^+$  cumple con la siguiente ecuación:



La energía cinética con la cual es emitido un positrón alcanza un máximo de  $545$  keV. Sin embargo, como se muestra en la Figura 15, el valor de energía de emisión más probable es cercano a  $200$  keV. Esta energía inicial decrece rápidamente en unos pocos

picosegundos después debido al proceso de termalización. A pesar de las particularidades de éste, la pérdida de energía de los positrones depende fuertemente de la naturaleza molecular del material donde se encuentra y de su energía de emisión. Como ya se ha mencionado, el rango de implantación de los positrones dentro de un material es del orden de 10 a 1000  $\mu\text{m}$  hasta que alcanza energías de valores térmicos.



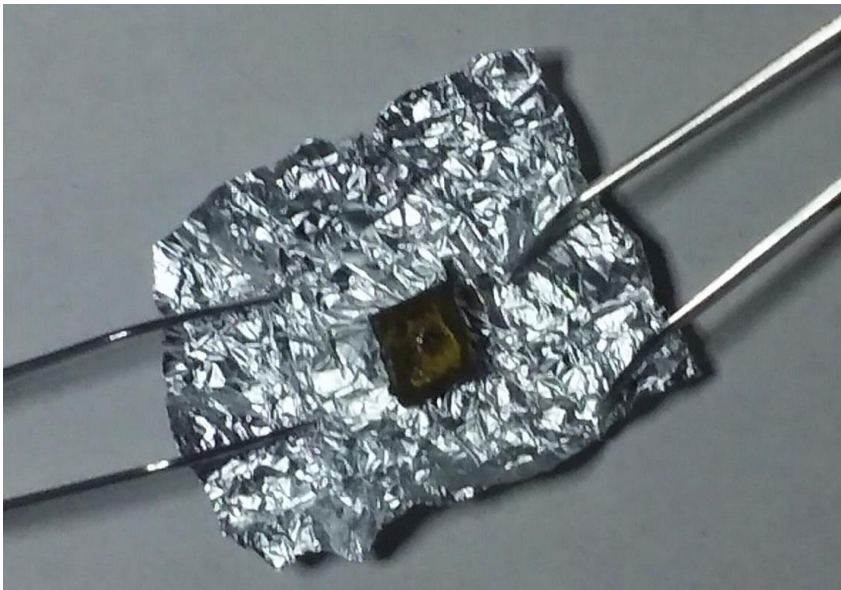
**Figura 15: Distribución de energías de los positrones emitidos por la fuente.**

Después de la termalización, el positrón aún puede difundir unos 100 nm más. Por ejemplo, en agua, se evaluó que para positrones con energía media de 215 keV, el rango de implantación es de aproximadamente 280  $\mu\text{m}$ .

La fuente de  $^{22}\text{Na}$  tiene la particularidad de que unos picosegundos más tarde de haber emitido el positrón, el núcleo remanente emite un fotón de 1274 keV, es decir, la emisión de éste fotón ocurre prácticamente en simultáneo con la emisión de la partícula de carga positiva. Esta característica es esencial para adquirir los espectros mediante PALS: la emisión gamma en coincidencia con la emisión del positrón es la que permite iniciar la medida de las vidas medias, ya que tomamos como inicio (**start**) la señal adquirida a partir

de este evento. El tiempo de vida media de un positrón emitido por la fuente es medido como el valor del tiempo transcurrido entre la señal de **start**, de 1274 keV, y la señal de **stop** que se produce cuando se detecta un rayo gamma de 511 keV propio de la aniquilación del positrón.

La fuente fue preparada mediante la evaporación de aproximadamente 10 $\mu$ Ci de una solución salina de  $^{22}\text{Na}$ - NaCl sobre una lámina de kapton, delgada, cuadrada de 1cm de arista y de 1,42 gr/ml de densidad. Para sellar esta fuente se utilizó un segundo trozo de kapton de igual material y dimensiones que el primero para luego ser adheridos con pegamento sobre sus márgenes externos. De esta forma la fuente queda aislada entre ambas láminas de kapton, como se observa en la Figura 16. Este depósito sellado permite que aproximadamente el 95% de los positrones emitidos en su interior escapen y se introduzcan en el material bajo estudio. De todas formas, existe la posibilidad de que ocurran aniquilaciones dentro del kapton y el pegamento, hecho que debe tenerse en cuenta para corregir las contribuciones espurias al momento de analizar los datos adquiridos. La corrección de los espectros por aniquilaciones en la fuente de positrones se realiza midiendo con esa misma fuente una muestra de referencia en la que los tiempos de aniquilación son conocidos.



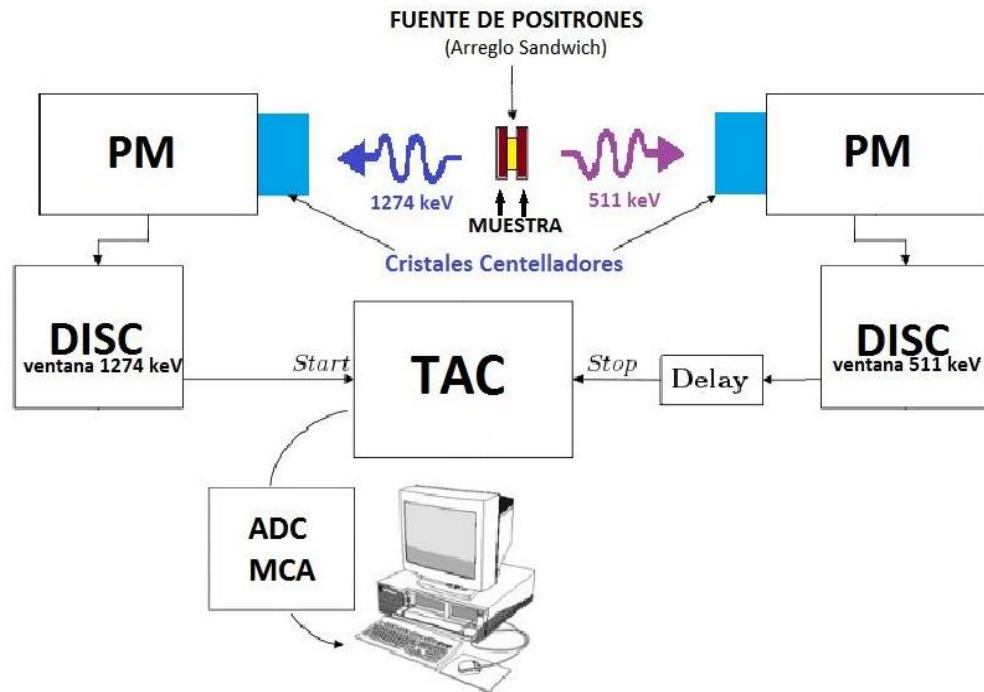
**Figura 16: Fuente de  $^{22}\text{Na}$  sellada.**

Para realizar las medidas PALS, la fuente se coloca en una conformación espacial denominada “Arreglo Sándwich” la cual consiste en colocar la fuente de positrones entre dos porciones iguales del mismo material a medir, como se muestra en la parte superior de la Figura 17. Como se ha mencionado anteriormente, es necesario que el espesor de ambas muestras sea mayor que el valor del rango máximo de implantación de los positrones, de modo de asegurar que una alta fracción de las aniquilaciones suceda en el interior de las muestras y de evitar que los positrones se escapen del volumen a medir. Para garantizar lo antedicho, en este trabajo se realizaron cortes de manera de obtener porciones de los órganos cuyos espesores fueran mayores a 5 mm.

Adicionalmente, al momento de construir el arreglo, se procuró que las muestras a medir estuvieran en íntimo contacto con el kapton de tal forma que no quedara aire entre la fuente y las muestras. Esto, junto con el espesor, permite minimizar las aniquilaciones espurias por fuera del medio material a medir.

#### 3.2.2.2. Dispositivo experimental.

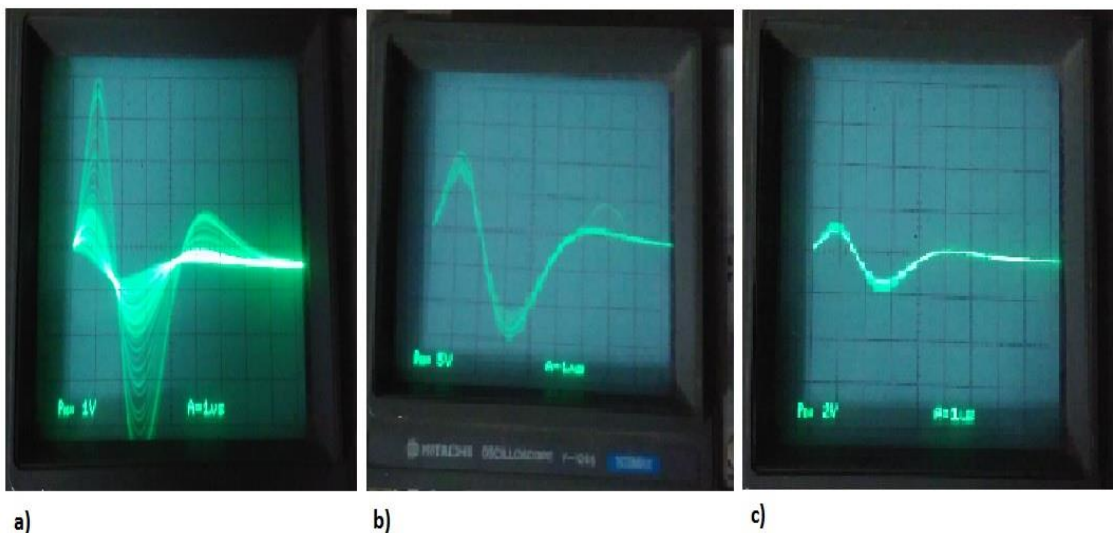
Como se mencionará en la sección 3.2.1.3 el proceso de mayor probabilidad de aniquilación de un positrón en un material es el que resulta en la emisión de dos rayos gamma, en trayectorias opuestas sobre la misma dirección de movimiento, de 511 keV cada uno. Al usar  $^{22}\text{Na}$  como emisor de positrones es posible saber el momento en el que estas partículas fueron emitidas, detectando la emisión gamma de 1274 keV. De esta forma, al detectar la diferencia en el tiempo transcurrido entre las dos emisiones electromagnéticas, se determina la vida media de los positrones dentro del material.



**Figura 17: Diagrama del dispositivo experimental utilizado.**

En este trabajo las medidas se realizaron con un espectrómetro convencional rápido-rápido cuya disposición esquemática se muestra en la Figura 17. Este dispositivo experimental utiliza dos detectores de centelleo: uno con un cristal plástico (BURLE) y otro con un cristal de BaF<sub>2</sub> (Fluoruro de Bario), acoplados a fotomultiplicadores. Las señales de salida de los ánodos de los fotomultiplicadores (PM) son analizadas con discriminadores diferenciales de fracción constante (CFDD) que permiten seleccionar el rango de energía de los fotones incidentes. Los CFDD presentan dos selectores, o ventanas: *upper level* y *lower level* que posibilitan el ajuste del intervalo de energías de trabajo. La respuesta del módulo es una señal lógica que se produce si y sólo si la amplitud de la señal de entrada está comprendida entre los dos valores que determinan los límites inferior (*lower level*) y superior (*upper level*) de aceptación de la señal. En el caso en que la amplitud de la señal de entrada no verifique las condiciones que le imponemos al módulo discriminador no suministrará señal alguna. A tal fin, y con el objetivo de ajustar las ventanas de forma que proporcionen una correcta estimación de las vidas medias, se utilizó un osciloscopio conectado a la salida del discriminador para poder observar la señal que recibe al colocar

el arreglo muestras-fuente delante de los detectores. Así se monitorea la señal de cada discriminador y se ajusta de forma que uno de los detectores responda, como señal de *start*, a valores cuya amplitud de energías sean cercanas a la de la emisión gamma de 1274 keV mientras que al otro se lo ajusta de la misma manera para que suministre una señal lógica de *stop*, pero cuyos selectores verifiquen como señal de entrada amplitudes del orden de energías correspondientes a los eventos de aniquilación de 511 keV. En la Figura 18 se visualizan las señales que registra el osciloscopio a la salida de los fotomultiplicadores, comparadas con las señales de salida de cada discriminador luego de realizados los ajustes correspondientes.



**Figura 18: Señales monitoreadas mediante osciloscopio. a) Señal completa, todas las energías, a la salida del amplificador, b) Señal a la salida de CFDD ajustada para energías del orden de 1274 KeV, c) Señal a la salida de CFDD ajustada para energías del orden de 511 KeV.**

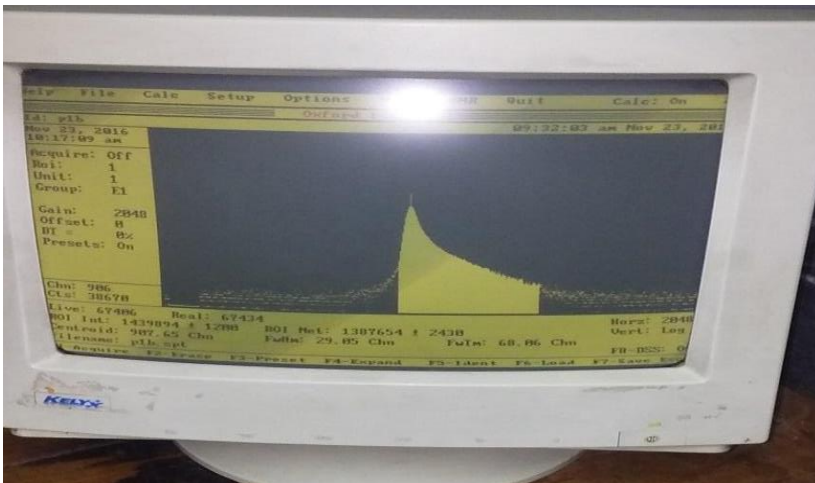
Las señales lógicas procesadas en los discriminadores son dirigidas al módulo convertidor de tiempo en amplitud (TAC) el cual elabora un pulso analógico de altura proporcional al tiempo transcurrido entre la llegada de la señal de *start* y de *stop* respectivamente; y, por consiguiente, a la vida media del positrón dentro del medio. Es de suma importancia el rol que cumple el dispositivo retardador de tiempo (*delay*), conectado a la salida del



discriminador que recibe la señal de *stop*, ya que así se asegura que esta última llegue siempre después de la señal de *start* al TAC. Asimismo, este retardo garantiza que la mayor parte de los eventos de coincidencia les correspondan pulsos de amplitudes adecuadas a la salida del módulo convertidor de tiempo en amplitud.

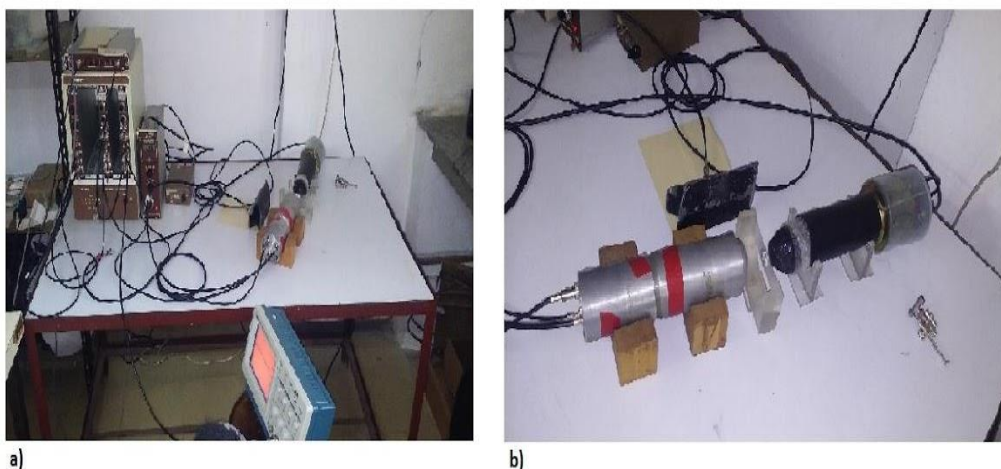
La salida del TAC es digitalizada por un conversor analógico-digital (ADC) que se conecta a la salida de dicho módulo, para ser dirigida finalmente al analizador multicanal (MCA) que se encarga de contar los pulsos digitales recibidos y los acumula en canales discriminados por altura de pulso, es decir, por el tiempo correspondiente. La correlación entre canales y tiempo se denomina calibración temporal del equipo en nuestro caso debido a los requisitos seleccionados se estableció en un valor de 24,4 ps/canal.

Finalmente, en el momento en que el histograma producido por el MCA alcanza una cantidad de eventos (cuentas) suficientes, se obtiene un espectro de vidas medias como puede observarse en la Figura 19.



**Figura 19: Espectro característico de una medida PALS sobre un sistema biológico. Foto obtenida a partir de las medidas realizadas en este trabajo.**

El dispositivo experimental utilizado para la obtención de las medidas del presente trabajo se muestra en la Figura 20.



**Figura 20: Equipo experimental utilizado para realizar las medidas PALS en tejidos biológicos. a) espectrómetro de vidas medias; b) detectores con arreglo sándwich entre ellos.**

### 3.2.2.3. Resolución Temporal y Análisis de Datos.

En esta sección se analizará de forma general los datos que proporciona el espectro de vidas medias obtenido a partir de una medición PALS de una fuente de  $^{22}\text{Na}$  interpuesta entre dos muestras de material biológico.

En primer lugar, es de central importancia conocer cuál es la resolución temporal real con la cual el equipo adquiere los espectros. La resolución temporal se obtendrá observando dos eventos simultáneos: si bien el espectro ideal esperado sería el correspondiente a la función delta de Dirac<sup>5</sup>, esto no es lo que sucede realmente.

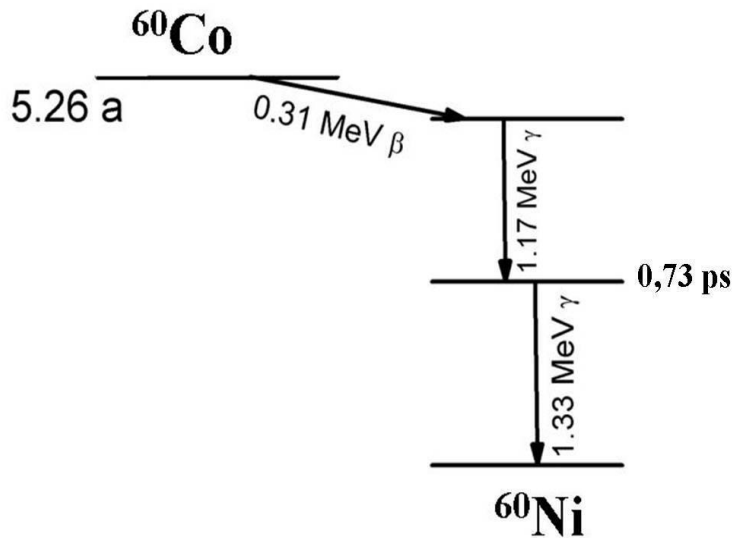
---

<sup>5</sup> La delta de Dirac o función delta de Dirac es una función matemática o distribución generalizada que fue postulada e introducida en el campo de la matemática y la física por el físico inglés Paul Dirac y, se define como el límite de una sucesión de funciones que tiende a cero en todos los puntos del espacio con excepción de un punto para el que se hace infinita; de aquí la definición dada por la función definida a trozos:

$$\delta_a = \delta(x - a) = \begin{cases} \infty, & x = a \\ 0, & x \neq a \end{cases}$$

Comúnmente en física la delta de Dirac se usa como una distribución espectral de probabilidad ideal y por su definición, de hecho, es una distribución (en el sentido de Schwartz). Su forma funcional describe un pico de altura infinita cuyo ancho es igual a cero, de manera que su integral resulta exactamente igual a la unidad.

Para poder conocer la resolución temporal se reemplaza el conjunto muestra-fuente por una fuente radioactiva de  $^{60}\text{Co}$ , la cual se desintegra por emisión  $\beta^-$  a un estado metaestable del  $^{60}\text{Ni}$  de energía 2,5 MeV. Este núcleo se desexcita a su estado fundamental emitiendo dos rayos gamma en cascada de 1,17 MeV y 1,33 MeV respectivamente. El tiempo transcurrido entre ambas emisiones es de unos 0,73 ps. El esquema bajo el que ocurre la desintegración del  $^{60}\text{Co}$  se muestra en la Figura 22. Al medir la resolución temporal se deben mantener los parámetros del espectrómetro tal como fueron calibrados con el conjunto fuente-muestra, dejando la configuración de las ventanas de los discriminadores CFDD en las mismas posiciones en las que se establecieron con la fuente de  $^{22}\text{Na}$ . Al interponer la fuente de  $^{60}\text{Co}$  entre los detectores, la emisión de 1,33 MeV es analizada con la ventana energética de *start*, mientras que la señal que corresponderá al *stop* se genera a partir de la meseta Compton correspondientes a la emisión del rayo de 1,17 MeV. Es decir, que como la ventana del discriminador de *stop* sigue en la disposición en la que sólo produce señales para valores de energía del orden de los 511 keV, no le es posible detectar el gamma correspondiente a 1,17 MeV. Empero, la región Compton debida a esta emisión, posee energías máximas del orden necesario para que se produzca la señal de *stop*, y de esta manera obtenemos el espectro correspondiente a la respuesta temporal del equipo. Como la diferencia temporal entre las dos emisiones del  $^{60}\text{Co}$  es muy pequeña se puede considerar nula. Idealmente, como se ha mencionado, una resolución temporal de los detectores igual a cero, es decir, cuya respuesta temporal fuera infinita nos proporcionaría como resultado una curva de calibración del tipo delta. Sin embargo, esto no es posible en la práctica, ya que las respuestas temporales del equipamiento son finitas y en lugar de una función tipo delta observamos un espectro de coincidencias, similar a una distribución gaussiana.



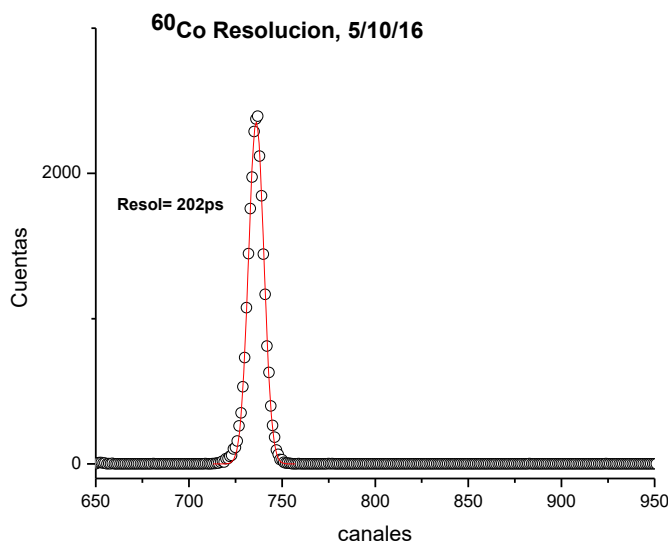
**Figura 22: Esquema de desintegración del  $^{60}\text{Co}$**

El espectro de coincidencias que resulta del  $^{60}\text{Co}$  se exhibe en la Figura 23. Esta curva característica, denominada comúnmente como curva *prompt*, permite determinar la resolución temporal de trabajo y proporciona el intervalo de tiempo de vida mínimo que podemos resolver realmente con el equipo de medida. La resolución temporal queda definida entonces por el ancho a mitad de altura de espectro (FWHM) del  $^{60}\text{Co}$  en unidades de tiempo fijadas a partir de la calibración temporal, que para este caso es de 24,4 ps por canal.

Entre los factores que afectan la resolución temporal del equipo se encuentran la dispersión temporal en la desexcitación del cristal centellador mediante la emisión de fotones (en el rango de luz visible y/o ultravioleta), la incidencia de este tipo de fotones sobre el fotocátodo y la respuesta de los discriminadores.

En nuestro caso, la resolución temporal de las medidas fue del orden de 202 ps, 8 canales ocupados por la longitud del ancho a media altura de la curva. Esta resolución es la mejor que se obtuvo luego de varios intentos de mejorar la respuesta en tiempo del equipo. Entre las pruebas para mejorar la resolución se realizó el desarmado, y nuevo acoplamiento del sistema cristal-fotomultiplicador de ambos detectores. Previamente al

ensamblado del sistema se limpiaron y lijaron cuidadosamente ambos cristales, para eliminar defectos de relieve que pudieran interferir en la conversión de la radiación electromagnética que sucede en el interior de los mismos. Además, se realizó un minucioso y cuidadoso ajuste de las ventanas de energía de los CFDD correspondientes.



**Figura 23: Espectro de coincidencias obtenido con una fuente de <sup>60</sup>Co para una calibración de 24,4 ps.**

De todas maneras, considerando que los sistemas de interés en este Trabajo de Diploma se caracterizan por tener una alta probabilidad de formación del orto-positronio y que los tiempos de vida media de esta configuración particular están típicamente entre los 200 ps y 2000 ps, se considera que la resolución temporal obtenida es adecuada para realizar una evaluación preliminar de los alcances de la técnica PALS para caracterizar los sistemas bajo estudio.

Los datos que arroja una medida PALS son, como en el caso ya analizado del <sup>60</sup>Co, el número de cuentas en función del número de canal, o de tiempo relacionado a la calibración temporal. Antes del ajuste y análisis de los datos obtenidos se restan al espectro crudo, las coincidencias accidentales que pueden provenir de radiaciones asociadas a distintos procesos no deseados. Así se consigue un número de cuentas  $N(t)$

que es directamente proporcional al número de positrones que se aniquilaron dentro de las muestras en un lapso de tiempo determinado.

Se puede anticipar que los espectros de aniquilación que se obtengan a partir de la medida de tejidos biológicos sean una distribución continua de vidas medias, debido a que su estructura molecular presenta una gran cantidad de especies que sin duda proporcionan un grado muy alto de inhomogeneidades en su interior. Así, se puede intentar obtener a partir de los datos experimentales, una distribución de intensidades de las distintas vidas medias mediante un análisis centrado en la transformación de Laplace de los espectros obtenidos de manera tal que:

$$N(t) = N_0 f(I_i, \lambda_i, t) \quad (14)$$

Donde  $N_0$  es la cantidad inicial de positrones y  $f(I_i, \lambda_i, t)$  es el espectro de aniquilación que expresa la variación temporal de los positrones que se han aniquilado al tiempo  $t$ . Como se presentará en lo que sigue, los espectros PALS de sistemas biológicos aportan un grupo muy reducido de contribuciones discretas, por lo que el análisis de los datos se torna más simple y se efectúa descomponiendo  $N(t)$  en una sumatoria de términos discretos de tal manera que el espectro de aniquilación queda representado por:

$$f(I_i, \lambda_i, t) = \frac{d(1-n(t))}{dt} = \sum_i I_i \lambda_i e^{-\lambda_i t} \quad (15)$$

Donde  $I_i$  es el porcentaje de positrones que se aniquila por un dado proceso caracterizado por su vida media correspondiente y  $\lambda_i = 1/\tau_i$  que es la inversa de la vida media. Finalmente, el espectro se expresa de la siguiente forma:

$$N(t) = N_0 \sum_i \frac{I_i}{\tau_i} e^{-\left(\frac{t}{\tau_i}\right)} \quad (16)$$

Las contribuciones exponenciales discretas del espectro de aniquilación, en nuestro caso,

son tres. Éstas, como se expresa en la ecuación (16), resultan determinadas por las vidas medias e intensidades que predice el modelo de atrapamiento ( $\tau_1, I_1, \tau_2, I_2$ ) que incluyen las aniquilaciones debidas a positrones libres, para-positronio y atrapados en defectos, y una tercera componente definida por  $\tau_3$  e  $I_3$ , debida al proceso de aniquilación del orto-positronio dentro de la muestra.

Un parámetro de utilidad para el análisis que pretendemos desarrollar y que es frecuentemente obtenido para estimar la evolución de los sitios de atrapamiento independientemente del número de componentes de los espectros experimentales, se denomina vida media promedio,  $\tau_{av}$  y se puede calcular de la siguiente manera:

$$\tau_{av} = \int_0^{\infty} t f(I_i, \lambda_i, t) dt = \sum_i \tau_i I_i \quad (17)$$

En este trabajo nos limitaremos a desarrollar sólo estas últimas pautas de análisis para intentar determinar si la técnica PALS resulta adecuada como método para diferenciar órganos de roedores entre sí, de forma tal de poder caracterizar las muestras por su estructura nanoscópica y comparar los datos obtenidos con otros estudios ya reportados en los que se utiliza la misma técnica.

### **3.3. Análisis de los resultados: método de análisis de componentes principales.**

Una vez obtenidos los datos se realizó un estudio estadístico mediante el programa MSVP (Multi-Variate Statistical Package) utilizando una técnica de análisis multivariado conocido como análisis de componentes principales (ACP) [29].

Este análisis es útil cuando se desea explicar fenómenos cuya información está contenida y cifrada entre muchas variables que fueron medidas sobre un grupo de individuos o muestras ya que permite analizar cuáles de ellas aportan, desde un punto de vista estadístico, mayor información sobre el fenómeno estudiado.

La caracterización de sistemas mediante la recolección de una muestra de datos implica poner en juego distintas variables de medida, siendo muchas veces difícil visualizar

relaciones entre ellas. Además, es probable que alberguen una correlación entre sí: aquellas variables que tengan más correlación mutua podrían estar midiendo lo mismo desde dimensiones o puntos de vista diferentes. Por ejemplo, en estudios médicos, la presión sanguínea a la salida del corazón y a la salida de los pulmones, están fuertemente relacionadas.

El análisis factorial de componentes principales es un método algebraico-estadístico que intenta sintetizar y aportar estructura a la información contenida en una matriz de datos. Esto permite visualizar qué variables tienen mayor correlación entre sí, y cuáles no poseen ningún tipo de relación. Además, este método permite reducir la dimensión del número de variables consideradas al estudiar un fenómeno particular.

En esta sección se presentarán los fundamentos teóricos y empíricos del Análisis de Componentes Principales.



**Figura 24: Programa MSVP (MultiVariate Statistical Package)**

### 3.3.1. Análisis de componentes principales: fundamento del método.



Al recolectar información para caracterizar y diferenciar objetos, se intenta medir la mayor cantidad de variables posibles que pudieran describirlo. En la Espectroscopía de Aniquilación de Positrones la deconvolución de los espectros arroja información sobre la densidad electrónica y la existencia de defectos en el material donde se produce la aniquilación de los positrones. Dicha información está contenida en seis variables: los tres tiempos de vidas medias característicos y sus respectivas intensidades. Además, en el desarrollo experimental de este trabajo se midieron los porcentajes de secado a partir del cambio en la masa de cada muestra. Cada una de estas medidas serán las variables iniciales u originales, del estudio que aquí desarrollamos. Si se quisiera estudiar la correlación que existe entre estas variables debería considerarse la combinación de siete elementos tomados de a dos  $\binom{7}{2} = 21$  posibles coeficientes de correlación entre ellas, de allí que sea difícil visualizar sus relaciones.

Por otro lado, cuando hay una cantidad de variables considerables puestas en juego sobre el mismo objeto de estudio, podría existir una fuerte correlación en algunas de ellas, pudiendo así estar midiendo lo mismo desde una perspectiva diferente. Resulta necesario entonces reducir la cantidad de variables para dar identidad, interpretar y proponer una estructura al conjunto que ellas componen y así apreciar las relaciones, o agrupamientos existentes. El método del Análisis Componentes Principales (ACP) es un proceso matemático que permite estudiar la correlación que existe entre dos, o más variables cuantitativas y continuas; para investigar qué relación tienen una con la otra y reducir su número, con respecto al número de componentes iniciales, de una manera simple, sin perder la información que cada una contenga.

Las técnicas ACP fueron inicialmente desarrolladas por Karl Pearson a finales del siglo XIX y retomadas por Harold Hotelling en la década del treinta. Sin embargo, no fueron muy utilizadas hasta el arribo de las computadoras, donde se empezaron a popularizar. El procedimiento consiste básicamente en homologar la matriz de datos en un espacio vectorial intentando hallar, en éste, dimensiones (ejes coordenados) que, además de ser una combinación lineal ponderada de las variables originales, cumplan con las siguientes exigencias [30]:

- a) No deben perder la información inicial que aportan las variables originales. Cabe aclarar aquí, que cuando hablamos de cantidad de información, nos referimos estadísticamente a la variabilidad o varianza que poseen los datos obtenidos; es decir, que cuanto mayor sea la variabilidad entre los datos de una variable (varianza) mayor será la información contenida en ella. Por lo tanto, estos nuevos ejes deben retener esa información conservando la varianza total de la matriz de datos iniciales.
- b) No poseer correlación alguna entre ellos, esto significa que se le impone la condición de que sean linealmente independientes entre sí. Esto es lo que asegura la estructuración de las componentes originales; que, si deberían tener algún tipo de relación entre sí, sino el análisis no tendrá ninguna razón ni sentido.
- c) Que posean un valor diferencial y conocido en la explicación de la varianza total del modelo bajo estudio.

Por lo tanto, si se cumple con estas consideraciones generales, se pueden estudiar las relaciones entre un número  $p$  de magnitudes variantes, que midan información común, realizando una transformación lineal del conjunto de esas  $p$  componentes originales en otro conglomerado de nuevas dimensiones que no tengan correlación entre sí. Esto significa que estas nuevas componentes construyan una base ortogonal, cuyos elementos sean perpendiculares entre sí, y no contengan redundancia o repetición de la información. A estas nuevas dimensiones se la denomina componentes principales del sistema.

Las componentes principales son combinaciones lineales de las variables originales y se van trazando a partir del orden de importancia de acuerdo a la varianza total que recogen del fenómeno bajo estudio (Ver Apéndice A).

### 3.3.2. Interpretación de los resultados en el método ACP.

El proceso de Análisis de Componentes Principales se puede resumir en cinco etapas fundamentales [30].

1ra Etapa: Cálculo de los Ejes o Componentes Principales

2da Etapa: Cálculo de las varianzas incorporadas a cada componente, a partir de los valores propios, y del número de ejes a retener para el análisis.

3ra Etapa: Reconstrucción de la matriz de objetos medidos sobre las nuevas componentes retenidas.

4ta Etapa: Cálculo de correlación entre las variables originales y los ejes retenidos, reconstrucción de la matriz de correlación

5ta Etapa: Interpretación de las componentes principales.

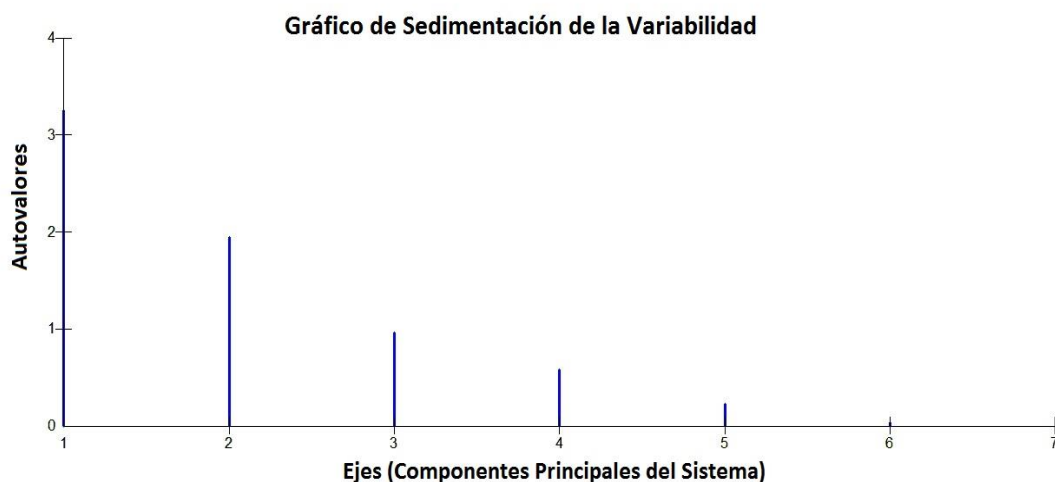
Las primeras cuatro etapas corresponden al cálculo de los ejes, varianzas, covarianzas, autovalores y autovectores asociados, porcentajes de varianza acumulada por cada componente y coeficientes de correlación entre las variables originales y los ejes obtenidos. Dicho cálculo se realiza bajo el marco teórico desarrollado en el Apéndice A y, en nuestro caso, es llevado a cabo por el programa de cálculo MVSP, utilizado para realizar el análisis de la matriz de datos obtenida a partir de la investigación propuesta en este Trabajo de Diploma. Posteriormente, se concluye con la interpretación de los resultados arrojados por dicho programa.

Como existen varios modos de llevar a cabo un estudio de estas características, es necesario tener en cuenta dos consideraciones importantes:

1- En primer lugar, se centrarán y estandarizarán las variables originales. Este centrado y estandarización permite trabajar con la matriz de correlaciones en lugar de la de covarianzas. Además, se les otorga a las variables iniciales igual importancia estadística. Es decir, si los datos originales estuvieran medidos en escalas con rangos diferentes, o si las unidades de medida no fueran proporcionales, tendrían un impacto distinto sobre el análisis y sobre las nuevas componentes. Mediante este procedimiento de estandarización y centrado, se homogenizan las variables originales y sus magnitudes serán del mismo orden. Así, sus roles en la construcción de las componentes principales no dependerán de sus rangos y unidades de medida.

2- En segundo lugar, existen convencionalmente varios criterios a la hora de determinar la cantidad de ejes a retener en el análisis. Es decir, con cuántos ejes vamos a trabajar para cumplir el objetivo de reducir la cantidad de dimensiones iniciales que posee el sistema

bajo estudio. Para ello, se considerarán dos de los criterios que se utilizan comúnmente a tal fin. El criterio principal consiste en tomar una cantidad de ejes tal que entre ellos acumulen al menos el 70 % de la varianza en sus valores propios. Esto permite hacer un buen análisis perdiendo una cantidad pequeña de información contenida; ya que, en general, son los primeros ejes los que acumulan la mayor proporción de variabilidad del sistema. El segundo criterio, se usa en simultáneo con el primero y es el que deriva de la Figura 25 donde se muestran los autovalores (dispuestos sobre el eje de las ordenadas) asociados a cada componente principal (dispuestas en el eje de las abscisas). El criterio aquí utilizado es simplemente que se retendrán en el análisis todos los ejes que posean un autovalor cuyo módulo sea mayor a la unidad. Estos ejes son a la vez los que acumulan la mayor proporción de la varianza del modelo.



**Figura 25: Gráfico de autovalores en función de los ejes (Componentes Principales) obtenido a partir del programa MVSP sobre la matriz de datos originales.**

En la Figura 25 se observa que para uno de los órdenes (el número 3), y su respectivo valor propio asociado, se produce un codo o quebrada de valle que se da en la componente, y valor propio, conveniente a ser tomada como criterio de corte. Es decir, que el análisis se realizará con todos los ejes cuyos autovalores estén por encima de este codo: para autovalores por encima o cercanos a la unidad. En nuestro caso, se utilizarán los dos

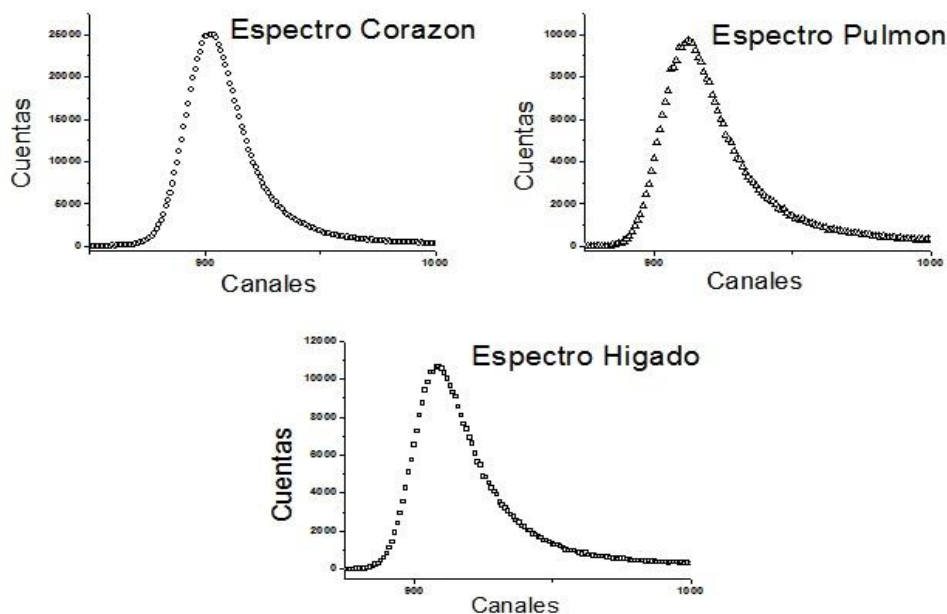
primeros ejes, cuyos valores propios están por encima de la unidad y que entre ellos acumulan casi el 78 % de la varianza total.

La cantidad de ejes retenidos, los criterios, restricciones e interpretación del espacio delimitado por las componentes principales logradas a partir del programa, están basados en el marco teórico que se desarrolla en el Apéndice A, al final de la obra.

## Capítulo 4. Resultados

### 4.1 Resultados PALS.

En esta sección se presentan los espectros PALS obtenidos en el presente trabajo. La Figura 26 muestra espectros típicos para los diferentes sistemas biológicos. Se expone a su vez el análisis de los resultados obtenidos teniendo en cuenta el modelo de atrapamiento desarrollado brevemente en el capítulo anterior.



**Figura 26: Espectros correspondientes a distintos órganos, en todos los casos el eje y corresponde a cuentas adquiridas y el eje x a canales.**

Una vez realizadas las medidas PALS, los espectros de vida media obtenidos se analizan mediante técnicas iterativas de mínimos cuadrados semilineales del tipo Levenberg–Marquardt<sup>6</sup>. El modelo matemático es una suma de exponenciales que se convolucionan

---

<sup>6</sup> Es un algoritmo que fue presentado por Levenberg en su artículo publicado el año 1944 titulado: “Método para la solución de ciertos problemas no lineales en mínimos cuadrados”, el cual fue complementado en el artículo de Marquardt publicado el año 1963 cuyo título fue: “Un algoritmo para estimación de mínimos cuadrados de parámetros no lineales”. Este algoritmo, conocido como el método de mínimos cuadrados amortiguados (DLS), se usa para resolver problemas de mínimos cuadrados no lineales y propone un

con la función de resolución gaussiana, obtenida a partir del espectro del  $^{60}\text{Co}$ , con un fondo constante agregado. La función de aniquilación es por lo tanto:

$$f(t) = N(t) \otimes R(t) + F \quad (18)$$

Donde  $N(t)$  es el espectro de aniquilación,  $R(t)$  la resolución correspondiente y  $F$  es el fondo. Este análisis se realiza mediante el programa POSITRONFIT [31], al que se le pueden fijar valores imponiendo un cierto número de vidas medias e intensidades relativas.

En todos los casos, la implementación de este programa permitió descomponer los espectros en tres contribuciones exponenciales decrecientes caracterizadas por  $\tau_i$ , enumeradas de menor a mayor conforme aumenta el tiempo de vida media. Cada una de ellas con una intensidad relativa  $I_i$  asociada, como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5: Resultados obtenidos a partir de las medidas PALS: vidas medias y sus respectivas intensidades porcentuales. A cada medida se asigna el porcentaje de secado correspondiente.**

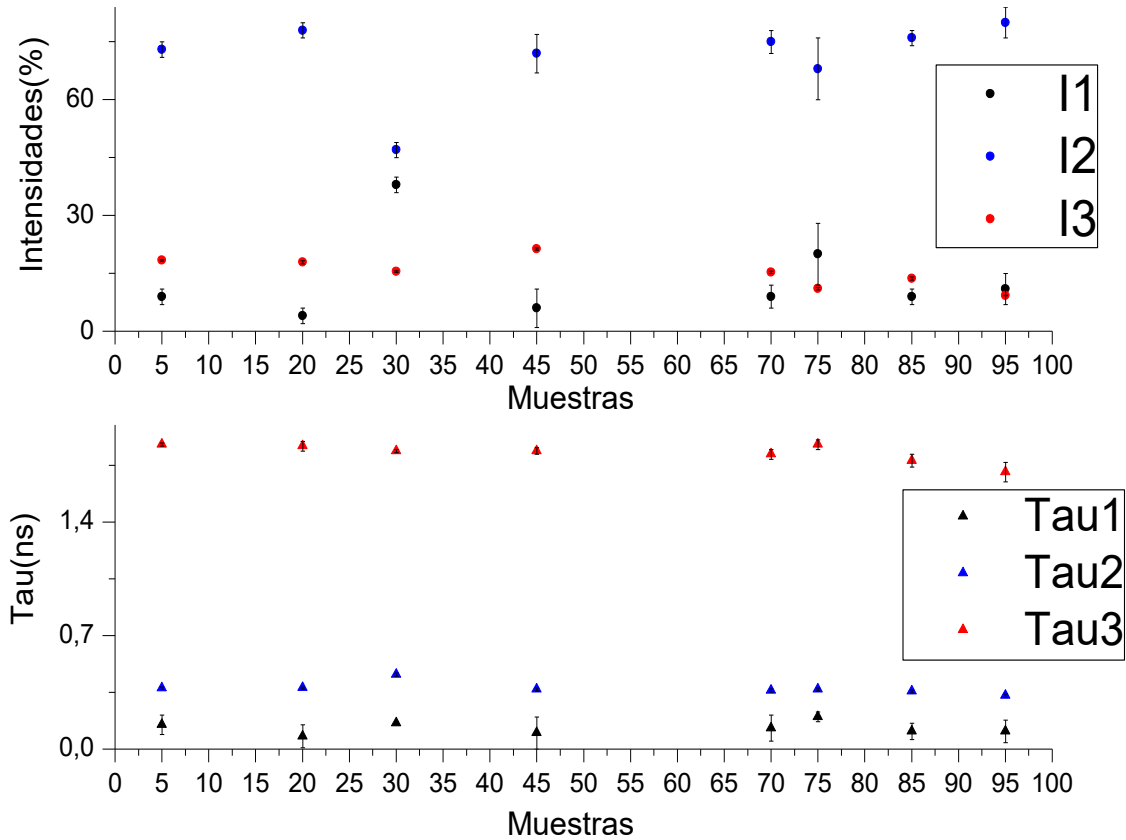
Muestras	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$\tau_3$ (ns)	$\tau_{av}$	$I_1(\%)$	$I_2(\%)$	$I_3(\%)$	Porcentaje de secado (%)
Hígado (5)	0,15 (6)	0,377 (7)	1,88 (1)	0,63 (2)	9 (2)	73 (2)	18,4 (2)	37,9
Hígado sin fuente (20)	0,08 (7)	0,368 (6)	1,87 (3)	0,63 (3)	4 (2)	78 (2)	17,9 (4)	49,3
Pulmón (30)	0,16 (1)	0,46 (1)	1,84 (1)	0,56 (3)	38 (2)	47 (2)	15,5 (2)	45,8
Pulmón sin fuente (45)	0,1 (1)	0,37 (1)	1,84 (2)	0,67 (85)	6 (5)	72 (5)	21,4 (3)	51,7
Corazón (70)	0,13 (8)	0,362 (1)	1,82 (3)	0,56 (4)	9 (3)	75 (3)	15,3 (3)	53,0
Cerebro (75)	0,20 (3)	0,37 (1)	1,88 (3)	0,46 (5)	20 (8)	68 (8)	11,1 (3)	48,3

Hígado (Rata2) (85)	0,11 (5)	0,357 (9)	1,78 (4)	0,52 (3)	20 (8)	68 (8)	11,1 (3)	49,9
Corazón (Rata2) (95)	0,11 (7)	0,33 (1)	1,71 (6)	0,52 (3)	11 (4)	80 (4)	9,30 (5)	54,3

La primera componente,  $\tau_1$ , es la vida media de menor duración y se asocia a las aniquilaciones más rápidas, debidas principalmente a la formación del p-Ps y aniquilaciones con los electrones libres en el volumen de la muestra. La segunda,  $\tau_2$  refleja las aniquilaciones debidas a los atrapamientos en zonas de la red interna del material donde hay menor densidad electrónica; ambas vidas medias, junto con sus intensidades asociadas, quedan definidas a partir del modelo de atrapamiento. La tercera componente,  $\tau_3$ , es la de mayor duración y está relacionada con la formación del o-Ps y su atrapamiento dentro de cavidades de mayor tamaño (mayores a 1,06 Å) intrínsecas del medio. Tanto  $I_3$  como  $\tau_3$  son los parámetros de aniquilación del o-Ps en cavidades donde queda atrapado, defectos del material de tipo volumen libre. Asimismo, posee un valor prácticamente constante para todas las muestras, de alrededor de 1800 ps. El valor de esta componente es similar al reportado para aniquilación del o-Ps en agua pura [32]. Puede observarse también, que sus correspondientes intensidades varían en la misma relación que el grado de humedad reportado para cada muestra. Haciendo uso de la ecuación (12), que nos proporciona el modelo de Tao-Eldrup, se obtuvo la dimensión de estas cavidades resultando un radio promedio de 2,5 Å.

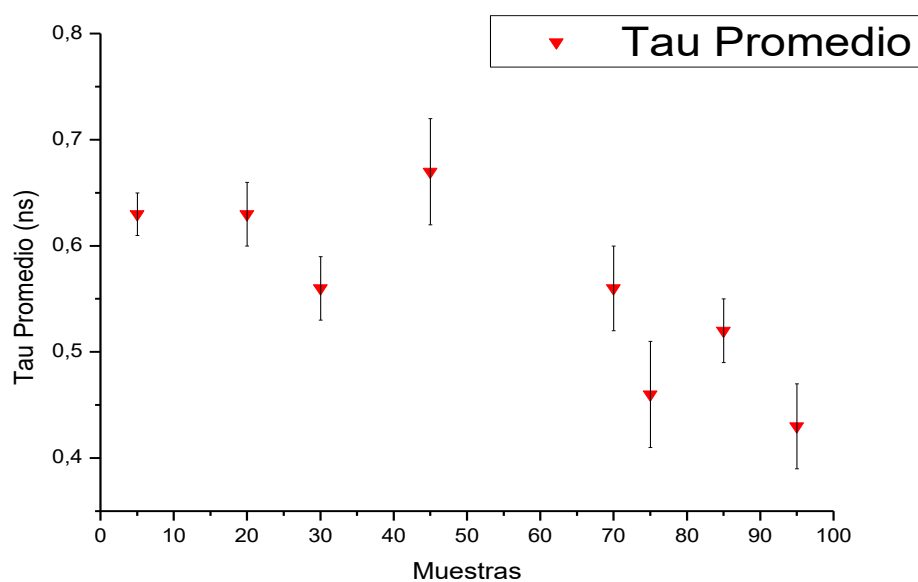
Las Figuras 27 a y b muestran las vidas medias y las intensidades resultantes de los órganos estudiados.





**Figura 27:** Gráficos comparativos de las tres componentes de vidas medias y de las intensidades correspondientes obtenidas para cada muestra. En el eje horizontal 5 y 20 son las muestras de hígado, con y sin fuente; 30 y 45 ídem para pulmón; 70 corazón; 75 cerebro, 85 y 95 son muestras de hígado y corazón de un segundo roedor.

A simple vista los valores de las tres vidas medias parecen no aportar ninguna conclusión contundente que permita hacer una caracterización absoluta de las muestras a partir de los parámetros PALS obtenidos. Así como tampoco muestran una relación constante entre los mismos tipos de muestras para diferentes individuos. Se puede apreciar, a partir de la tabla y los gráficos, un gran solapamiento entre las medidas y sus márgenes de error. Además, existe una gran dispersión entre órganos con las mismas características que pertenecen a roedores distintos.



**Figura 28: Comparación de los Tau promedio de cada muestra. En el eje horizontal 5 y 20 equivalen a las muestras de hígado, con y sin fuente; 30 y 45 equivalen a las muestras de pulmón, con y sin fuente; 70 corazón; 75 cerebro, 85 y 95 son muestras de hígado y corazón de un roedor diferente.**

Dado que los datos reportados en la Figura 27 no parecen mostrar ningún patrón específico en el comportamiento de las muestras, se calculó la vida media promedio  $\tau_{av}$  de acuerdo a la ecuación 17 del apartado 3.2.2.3 (Figura 28). Este parámetro tampoco muestra una relación firme entre órganos de igual características para individuos diferentes, así como también se ve un gran solapamiento entre las medidas y sus errores relativos.

De lo hasta aquí expuesto, se puede concluir que debido a que los tejidos biológicos contienen agua en su composición y que la vida media de aniquilación del o-Ps obtenida en este trabajo,  $\tau_3$ , es de 1800 (20) ps (similar a la del agua pura), podemos asignar esta vida media a la presencia de agua en el tejido estudiado. El hecho que la correspondiente intensidad  $I_3$  disminuye al aumentar el secado de la muestra biológica da sustento a esta asignación.

Dada la gran dispersión de valores en los parámetros de aniquilación observada entre los diferentes tejidos y especímenes, no pudiendo obtener una caracterización más precisa, se encaró un estudio estadístico. Este estudio estadístico de la matriz de datos obtenida a partir de las medidas correspondientes, analizando la existencia de correlaciones entre las variables, se desarrolla en la siguiente sección. A tal fin, se propone un análisis multivariado de componentes principales sobre la matriz de datos adquirida a partir de las medidas PALS sobre las muestras biológicas.

## 4.2 Resultados ACP.

En lo que sigue se expondrán todos los resultados y análisis del método ACP a fin de interpretar, justificar la aplicabilidad y potencialidades de la técnica PALS para el estudio de materiales biológicos.

En lo que sigue se intentará explicar las relaciones encontradas sobre las medidas PALS con las dos primeras componentes principales del sistema obtenidas a partir de la matriz de datos adquirida en el desarrollo experimental de este trabajo. Para tal fin se utilizó el

programa MVSP para calcular los autovalores, autovectores y coeficientes de correlación correspondientes a la obtención de los ejes, para la estandarización y centrado de las variables originales y para la construcción del gráfico (que nos permite observar e interpretar la distribución de cada muestra y cada variable original, sobre el espacio determinado por las componentes principales retenidas).

La Tabla 6 muestra los autovalores, el porcentaje de varianza asociado a cada componente principal y el porcentaje total acumulado. En la Tabla 7 se encuentran expresados los valores de los coeficientes de correlación de cada variable original respecto a los ejes 1 y 2 respectivamente; que permite interpretar las componentes con las que trabajaremos.

**Tabla 6: Autovalores, porcentajes y porcentaje acumulado de las componentes principales.**

	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5	Eje 6	Eje 7
Autovalores	3,450	1,995	0,983	0,398	0,130	0,044	0,000
Porcentaje	49,279	28,506	14,038	5,692	1,861	0,624	0,001
Porcentaje Acumulado	49,279	77,785	91,823	97,514	99,375	99,999	100,000

Nótese que a partir del eje 3 en adelante los autovalores de cada dimensión son menores a uno y cada uno de ellos va aportando sucesivamente menor porcentaje de varianza al conjunto de componente. Por esto, se trabajará sólo con los primeros dos ejes que acumulan el mayor porcentaje de variabilidad contenido en las medidas correspondientes, siendo el primer eje el que aporta la mayor información estadística; casi el 50 % de la variabilidad del fenómeno estudiado se concentra en esa componente.

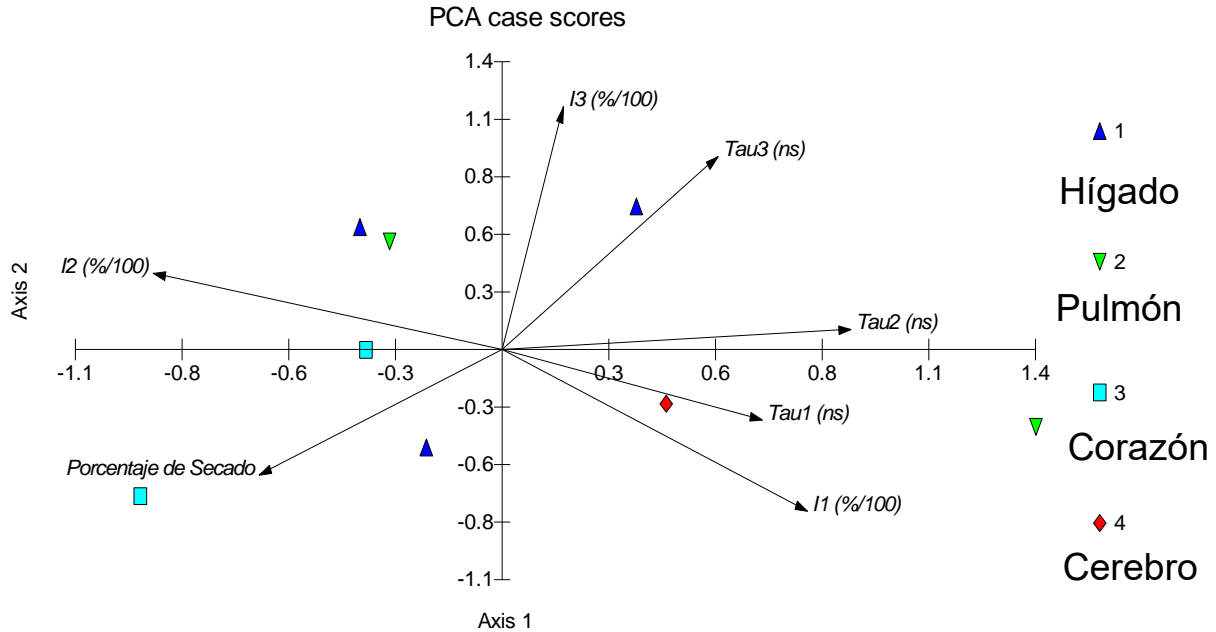
**Tabla 7: Coeficientes de correlación entre las variables originales y las componentes principales.**

	Eje 1	Eje 2
A- $\tau_1$ (ns)	0,363	-0,182
B- $\tau_2$ (ns)	0,486	0,053
C- $\tau_3$ (ns)	0,301	0,500
D- $l_1$ (%/100)	0,426	-0,418
E- $l_2$ (%/100)	-0,488	0,198
F- $l_3$ (%/100)	0,085	0,629

G-Porcentaje de Secado	-0,340	-0,324
------------------------	--------	--------

Si se centra la atención en los coeficientes de correlación calculados se ve claramente que la primera componente principal (eje 1) está explicada mayormente por la contribución del tiempo de vida media de segundo orden,  $\tau_2$ , y su intensidad asociada,  $I_2$ , prácticamente con el mismo peso estadístico. Nótese también que, en menor magnitud, las variables  $\tau_1$  e  $I_1$  son la que siguen en importancia sobre este mismo eje. Otra consideración importante es que la segunda componente principal (eje 2) está determinada principalmente por las variables  $\tau_3$ ,  $I_1$  e  $I_3$  que son las de mayor peso estadístico sobre esta dimensión. En este caso,  $I_3$  es la que posee la mayor magnitud de correlación, seguida consecuentemente por su tiempo de vida media correspondiente  $\tau_3$ . Además,  $I_1$  mantiene una relación inversa con las otras dos variables (Figura 29). Una tercera consideración importante es que el porcentaje de secado tiene aproximadamente el mismo nivel de correlación con cada componente principal del sistema.

El gráfico de la Figura 29 muestra que cada una de las variables originales se exhibe como flechas dispuestas entre los ejes coordenados constituidos a partir de las componentes principales. Además, cada figura geométrica pertenece a un objeto observado que en nuestro caso corresponden a los distintos órganos. De esta forma, el gráfico permite ubicar, de manera concreta y sencilla, a cada variable medida y a cada muestra dentro del espacio conformado por las componentes principales que describen el sistema, demostrando en forma gráfica la distribución de correlaciones que subyacen entre sus magnitudes.



**Figura 29: Gráfico resultante del Análisis de Componentes Principales sobre la matriz de datos inicial a partir del programa MVSP.**

Cabe señalar un aspecto importante que se muestra en el ACP: el análisis del segundo eje también arroja una relación inversa entre la tercera componente de intensidad y el porcentaje de secado de las muestras. Es decir, a más seca la muestra, menor será el porcentaje de positrones que se aniquilan en un lapso de vida media del orden de  $\tau_3$ . Por lo tanto, esta relación es consecuente con lo obtenido en este trabajo, ya que anteriormente vinculamos esta vida media a la aniquilación del o-Ps dentro de la estructura de las moléculas de agua.

Claramente el análisis mediante el programa MVSP permite encontrar relaciones entre las variables originales e identificar cuáles de ellas aporta mayor información para caracterizar las muestras bajo estudio. Para nuestro caso particular, arroja que la variable que mejor caracteriza a las muestras biológicas bajo estudio es la segunda componente de vidas medias  $\tau_2$ .

## Capítulo 5. Discusión y conclusiones.

En el presente trabajo de diploma se ha llevado a cabo una investigación sobre la implementación de la técnica Espectroscopia de Aniquilación de Positrones en Modo de Medición de Vidas Medias sobre tejidos biológicos provenientes de órganos murinos. Para ello se realizó un análisis de los espectros temporales de aniquilación positrónica, y de su deconvolución, con el fin de determinar cuáles son los parámetros que permiten caracterizar y discriminar entre sí a los sistemas biológicos estudiados.

Si bien la alta complejidad y diversidad fisicoquímica que poseen los sistemas biológicos dificulta su caracterización absoluta a través del estudio de las vidas medias de aniquilación de positrones en relación a las dimensiones de las cavidades nanométricas que aquellos presentan; hemos logrado avanzar en este campo de aplicación y establecer, de forma cualitativa y cuantitativa, el alcance de los resultados PALS recolectados en el marco de este trabajo de investigación. No solo hemos obtenido información de utilidad para identificar los parámetros de la técnica que permiten realizar una caracterización sobre este tipo de materiales, sino que se pudo establecer su dependencia y relación con otros parámetros de interés medidos en el desarrollo de la presente obra.

En primer lugar, se determinó que la conservación y fijado de las muestras en solución de etanol al 70%, seguido de su secado en gel de sílice, resulta ser un método adecuado para el tratamiento y preparación de las muestras previo a su medida. Se pudo establecer el rango óptimo de secado que deben adquirir las muestras antes de ser colocadas en contacto con la fuente emisora de positrones. De esta manera se verificó la posibilidad de llevar a cabo estudios de materiales biológicos utilizando una fuente de  $^{22}\text{Na}$  sellada y contenida en kapton. Así como también se logró optimizar y garantizar la seguridad radiológica de los elementos de trabajo (materiales, instrumentos, laboratorio) utilizados en el desarrollo experimental descripto.

Se ha logrado avanzar en la puesta a punto en lo que refiere a la obtención, preparación y conservación de las muestras, teniendo en cuenta la relevancia que este factor supone para un análisis riguroso de los datos adquiridos. Es de notar que este aspecto no ha sido

considerado prácticamente en los reportes previos de estudios de estas características. Es posible que este hecho esté relacionado a la gran dispersión que poseen los datos que estas publicaciones reportan. Por lo que se supone que es un parámetro de interés que debe ser considerado e incluido en la evaluación de los resultados que aquí fueron presentados.

Nos centraremos ahora en la matriz de datos obtenida a partir de las medidas PALS, que comprenden a las tres componentes de vidas medias,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  y  $\tau_3$  y sus correspondientes intensidades asociadas. Se observa una gran uniformidad en el valor de la componente de vida media de mayor duración,  $\tau_3$  que es la que corresponde a las aniquilaciones debidas al o-Ps atrapado en las cavidades de volúmenes libres dentro de las muestras. Asimismo, las magnitudes obtenidas correspondientes a esta variable muestran un comportamiento casi constante para todas las muestras y son muy cercanas al valor medio reportado para el agua pura, 1800 (20) ps [32]. Además, a través de la ecuación (12), que proporciona el modelo Tao-Eldrup, se calculó el radio promedio característico de las cavidades que resultó ser de 2,5 Å. Este hecho permite suponer que las cavidades de cada muestra donde queda atrapado el positronio y finalmente se aniquila corresponden al agua remanente en el tejido una vez secado. Esta observación es consistente con lo expresado en la sección 1.3 del capítulo 1, donde se expuso que las células están compuestas en su gran mayoría por agua, entre un 75% y un 85 % del total de las sustancias que las constituyen. De esta manera arribamos a la conclusión preliminar de que la componente  $\tau_3$  no es un parámetro PALS que permita sensor las particularidades estructurales de los tejidos biológicos; ya que no es sensible a los defectos internos propios que estos materiales poseen, sino al agua que los constituye. Este hallazgo se contrapone con los que proporcionan las publicaciones ya citadas, que aseguran y centran su atención en el estudio de la  $\tau_3$  e  $I_3$  como únicos parámetros para la caracterización y diferenciación estructural de células normales y tumorales.

Los trabajos reportados en la literatura dejan asimismo de lado el análisis de las componentes de vidas medias de menor duración,  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , que, a partir de nuestro estudio,



son las que podrían proporcionar información sobre la estructura de este tipo de sistemas. Sin embargo, como ya se ha expresado en el capítulo 4, se hace dificultoso a partir de los datos crudos de las medidas PALS apreciar, distinguir y justificar cuál de estos parámetros podrían proporcionar información contundente en el caso de tejidos biológicos. Por esto se propuso la realización de un análisis estadístico multivariado de la matriz de datos de manera de ser rigurosos con las observaciones que se pueden realizar. Así, el estudio de los resultados a partir del programa MVSP demostró ser una herramienta útil para extraer información del conjunto de medidas adquiridas, siendo consecuente con la conclusión preliminar sobre el rol de la componente  $\tau_3$  e  $I_3$ . Además, resultó ser coherente con la relación inversa que debería poseer, de acuerdo a lo establecido previamente, el porcentaje de humedad de las muestras y la intensidad asociada a dicha componente. A partir del análisis de componentes principales (ACP) a través del programa de cálculo se concluyó que la componente de vida media que mejor caracterizaría a las muestras estudiadas, desde el punto de vista estadístico, es la  $\tau_2$  en conjunto con su intensidad correspondiente,  $I_2$ , que se asigna a la aniquilación de positrones atrapados en defectos. Por lo tanto, al momento de utilizar la técnica PALS para la caracterización de tejidos biológicos, se deben considerar en conjunto, todos los parámetros de aniquilación, no solo la componente correspondiente a la formación de o-Ps.

Se ha verificado que el ACP es una herramienta de utilidad para analizar la matriz de datos adquirida y las correlaciones existentes entre las variables que la determinan. Finalmente, cabe entonces destacar, la complementariedad demostrada entre la técnica experimental PALS y el análisis estadístico a fin de brindar información útil a la hora de evaluar su alcance para el estudio de la compleja estructura de materiales biológicos.

## Bibliografía

- [1]-P.Hautojarvi., *“Positrons in Solids”*, Springer-Verlag, Berlín, 1979.
- [2]-W.Brandt, A.Dupasquier., *“Positron Solid State Physics”*, North-Holland Pub.Co., Amsterdam, 1983.
- [3]-M.J.Puska and R.M.Nieminen. *“Theory of positrons in solids and on solid surfaces”*, Rev.Mod.Phys. 66, 841 (1994).
- [4]-J. De Vries. *“Positron lifetime –technique with Applications in Materials Science”*. Alemania, 1987.
- [5]-H.Chen, J.D. Van Horn and Y.C.Jean. *“Applications of Positron Spectroscopy to Life Science”*, Defect and Diffusion Forum Vol. 331 (2012), pp.275-293.
- [6]-Y. Jean,P. E. Mallon, D. M. Schrader. *“Principles and Applications of Positron and Positronium Chemistry”*, World Scientific, Singapore, 2003.
- [7]-M. M. Elias, Z. T. Al-Shiehani and A.H. Al-Mashhadani. *“Monitoring of tumour growth via the positronium lifetime method”*. Int. J. Sci. Res.16, 201-204 (2006).
- [8]-Y.C. Jean, Y Li, G. Liu, H. Chen, J. Zhang and J. E. Gadzia. *“Applications of slow positrons to cancer research: Search for selectivity of positron annihilation to skin cancer”*. Appl. Surf. Sci. 252 (2006) 3166-3171.
- [9]-G. Liu, H. Chen, L. Chakka, J. E. Gadzia and Y. C. Jean. *“Applications of positron annihilation to dermatology and skin cancer”*. Phys. stat. sol. (c)4, 3912–3915 (2007).
- [10]-S. H. Yang, C. Ballmann and C. A. Quarles. *“Positron Spectroscopy Investigation of Normal Brain Section and Brain Section with Glioma Derived from a Rat Glioma Model”*. AIP Conf. Proc. 1099, 948 (2009).
- [11]-E. Axpe , T. Lopez-Euba , A. Castellanos-Rubio, D. Merida, J. A. Garcia, L. Plaza-Izurieta, N. Fernandez-Jimenez, F. Plazaola , J. R. Bilbao. *“Detection of Atomic Scale Changes in the Free Volume Void Size of Three-Dimensional Colorectal Cancer Cell Culture Using Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy”*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083838> (2014). X
- [12]-G. Liu, H. Chen, L. Chakka, M.-L.Cheng, J. E. Gadzia, R.Suzuki, T.Ohdaira, N.Oshima and Y. C. Jean. *“Further search for selectivity of positron annihilation in the skin and cancerous systems”*. Appl.Surf.Sci. 255(2008) 115-118. X
- [13]-K. Chamerański, M. Stopa, P. Jelen, M. Lesniak, M. Sitarz, J. Filipiecki. *“Spectrochim Spectroscopic studies of the silicone oil impact on the ophthalmic hydrogel based materials conducted in time dependent mode”*. Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2017 Oct 18;192:1-5.

- [14]-A. Kowalewska, M. Nowacka, M. Włodarska, B. Zgardzińska, R. Zaleski, M. Oszejca, J. Krajenta, S. Kaźmierski. *“Solid-state dynamics and single-crystal to single-crystal structural transformations in octakis(3-chloropropyl)octasilsesquioxane and octavinyl octasilsesquioxane”*. Phys Chem Chem Phys. 2017 Oct 18;19(40):27516-27529.
- [15]-C. Yin, L. Wang, J. Li, Y. Zhou, H. Zhang, P. Fang, C. He. *“Positron annihilation characteristics, water uptake and proton conductivity of composite Nafion membranes”*. Phys Chem Chem Phys. 2017 Jun 21;19(24):15953-15961.
- [16]-M. Shirazinia, A. A. Mehmandoust-Khajeh-Dad, V. Dehghani, J. Mehmandoust-Khajeh-Dad, M. Khaghani. *“The Effect of Curing Light Intensity on Free Volume Size in Some Dental Composites”*. Polim Med. 2016.
- [17]-R. Zaleski, A. Kierys, M. Gorgol. *“Positron insight into evolution of pore volume and penetration of the polymer network by n-heptane molecules in mesoporous XAD4”*. Phys Chem Chem Phys. 2017.
- [18]-C. Fong, A. W. Dong, A. J. Hill, B. J. Boyd, C. J. Drummond. *“Positron annihilation lifetime spectroscopy (PALS): a probe for molecular organisation in self-assembled biomimetic systems”*. Phys Chem Chem Phys. 2015
- [19]- C. Y. Chain, L. C. Damonte y A. F. Pasquevich. *“Aplicación De La Espectroscopía De Aniquilación De Positrones En El Modo De Medición De Vidas Medias Al Estudio De Volúmenes Libres En Tumores Murinos”*. Sociedad Argentina De Física Médica – Safim (Argentinean Society Of Medical Physics), Asociación Argentina De Técnicos En Medicina Nuclear – Aatmn (Argentinean Association Of Nuclear Medicine Technologists). (2014) ISBN 978-987-25343-0-1.
- [20]-A. Somoza and A. López García. *“Caracterización y Estudio de Materiales por Técnicas Nucleares”*. 1998.
- [21]-W. Brandt and R. Paulin. *“Positron implantation-profile effects in solids”*. Phys. Rev. B, 15:2511{2518, 1977.
- [22]-Y. C. Jean and D. M. Schrader. *“Experimental techniques in positron and positronium Chemistry”*. 1988.
- [23]-R. M. Nieminen and M. J. Manninen. *“Positrons in imperfect solids: theory”*. Topics in Current Physics, 12, 145-195 (1979).
- [24]-R. N. West. *“Positron studies of lattice defects in metals”*. In Positrons in Solids, pages 89{144. 1979.
- [25]-S. J. Tao. *“Positronium Annihilation in Molecular Substances”*. The Journal of Chemical Physics 56 (11) 5499 (1972).
- [26]-M. Eldrup, D. Lightbody, J.N. Sherwood, Chem. Phys. 63 (1982) 51.

- [27]-K. Ito, H. Nakanishi and Y. Ujihira. *“Extension of the Equation for the Annihilation Lifetime of ortho-Positronium at a Cavity Larger than 1 nm in Radius”*. J. Phys. Chem. B 1999, 103, 4555-4558
- [28]-T. L. Dull, W. E. Frieze and D. W. Gidley, J. N. Sun and A. F. Yee. *“Determination of Pore Size in Mesoporous Thin Films from the Annihilation Lifetime of Positronium”*. J. Phys. Chem. B 2001, 105, 4657-4662
- [29]-G. A. F. Seber. *“Multivariate Observations”*. Copyright 1984 by John Wiley & Sons, Inc. Auckland, Nueva Zelanda 1938.
- [30]-C. Lozares Colina y P. López Roldán. *“Análisis de Componentes Principales: Aplicación al Análisis de Datos Secundarios”*. Dpto. de Sociología-Universidad Autónoma de Barcelona.
- [31]-P. Kiriegaard and M. Eldrup. *“Positronfit: a versatile program for analysing positron lifetime spectra”*. Computer physics communications 3 1972 (240-255), Danish Atomic Energy Commission Research Establishment Risø, DK-4000 Roskilde, dinamarca 1971.
- [32]- M. Eldrup. *“Positron Lifetimes in Water and Ice, and in Frozen Aqueous Solutions”*. Danish Atomic Energy Commission Research Establishment Risø. Risø Report No. 254 (1971).

## **Agradecimientos**

*Quiero agradecer profundamente a mis directoras Laura Cristina Damonte y Cecilia Yamil Chain por su trabajo, compromiso y su maravillosa manera de guiarme y acompañarme en el desarrollo de este trabajo de diploma. Dos hermosas personas, excelentes docentes, investigadoras, extensionistas que me han apoyado en los buenos y malos momentos a nivel personal y profesional. A ellas, todo mi afecto y admiración.*

*A el Dr. Gustavo Rinaldi, docente de la cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, y a todo el grupo de Investigación en Morfología y Función de las Células Beta Pancreáticas CENEXA-CONICET, facultad de Ciencias Médicas-UNLP: Lic. Mauricio Kraemer, Dra. Bárbara Maiztegui, Dra. Carolina Lis Román, Dr. Luis Emilio Flores, Dr. Juan José Gagliardino. Por su entera predisposición y ayuda a la hora de colaborar y nutrir de conocimiento en torno a la extracción y cuidado de las muestras utilizadas.*

*Al Ing. Jorge Runco, excelente docente de las cátedras de Electrónica, Análisis de Señales y Procesamiento de Imágenes Médicas, por su gran predisposición y colaboración en el armado y puesta a punto de la electrónica y programación del equipo de medición utilizado.*

*A la Doctora Patricia Alegretti, Docente Investigadora de la cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, por su predisposición y colaboración con el presente trabajo.*

*A mi tía, María Silvia Tomás, Lic en Ciencias Sociales y Humanidades, Universidad de Quilmes, el apoyo, la ayuda y su colaboración en el análisis estadístico de los datos obtenidos.*

*Agradezco a mis padres, Nelly y Roberto, por el apoyo incondicional que me brindaron siempre, por enseñarme a no bajar los brazos nunca, por tantas vidas de amor, de lucha, de arte y de ciencia. Las/os amos con todo mi ser.*

*A mi hermano por estar siempre en las buenas y en las malas, por el amor mutuo en todos los tiempos. Por él y su lucha.*

*A mi amor, mi compañera, Anabela, que me da fuerza todos los días para seguir adelante.*

*Quien me enseñó que los sueños se construyen, que el amor es la creación histórica más importante de la vida. Gracias por hacer que los días sean cada vez más hermosos a tu lado. Te amo profundamente.*

*A mi familia de sangre y adquirida en el tiempo, abuelas/os, madres, padres, amigas/os, hermanas/os del alma, sobrinas/os, tías/os, primas/os por todo el amor que nos hemos regalado en estos años. Sin ellas/os nada de esto hubiera sido posible.*

*A los amigos que me fortalecieron y me encaminaron en la vida con cada abrazo, cada sonrisa, cada reto. Los adoro infinitamente.*

*A mis compañeros de carrera por el cariño que siempre mantienen conmigo. Vamos que llegamos chicas/os.*

*A la agrupación estudiantil El Pelo de Einstein, por dejarme formar parte y construir un colectivo de cambio profundo dentro de la Universidad, un colectivo de organización, de lucha, de compañerismo, de transformación humana y social. Por enseñarme que tanto en la práctica revolucionaria como en el amor, se lucha codo a codo, cuerpo a cuerpo y piel a piel.*

*A la Facultad de Ciencias Exactas.*

*A las/os docentes de la carrera de Física Médica.*

*Al Departamento de Física.*

*A la Universidad Nacional de La Plata.*

*A la Educación pública y gratuita.*

## Apendice A

Cálculo de las Componentes Principales.

El modelo matemático subyacente a esta técnica descansa en tres pilares fundamentales. El primero es el tratamiento de la matriz de datos. Aquí se supone que esta cumple con las condiciones de un espacio vectorial euclídeo de  $p$ -dimensiones,  $(k_i \times V_j)$ : tantas como variables iniciales posea la matriz inicial. Si tenemos una serie de variables,  $(V_1, V_2, V_3, \dots, V_p) = \mathbf{V}_j$  ( $j=1, 2, 3, \dots, p$ ), sobre un grupo de objetos o individuos, en este espacio estos últimos son entidades puntuales  $k_i$  ( $i=1, 2, 3, \dots, n$ ): puntos que forman una nube  $N^n_p$ . Así, este conjunto de variable engendra un espacio vectorial del que se obtienen, a partir de ellas, un nuevo conjunto de componentes incorreladas entre sí, cuyas varianzas van decreciendo progresivamente. Llamaremos a este nuevo conjunto de variables  $\mathbf{U}_j = (U_1, U_2, U_3, \dots, U_p)$ .

Cada  $U_j$  es una combinación lineal de las  $V_1, V_2, V_3, \dots, V_p$  iniciales, por lo tanto podemos expresarlas como:

$$U_j = a_{1j}V_1 + a_{2j}V_2 + a_{3j}V_3 + \dots + a_{pj}V_p = \mathbf{a}'_j \mathbf{V} \quad (1)$$

Donde  $\mathbf{a}'_j = (a_{1j}, a_{2j}, a_{3j}, \dots, a_{pj})$  es un vector de componentes constantes, y

$$\mathbf{V} = \begin{bmatrix} V_1 \\ \vdots \\ V_p \end{bmatrix}$$

El segundo pilar es el método de maximización de la varianza. Condición necesaria para

hallar cada una de las componentes principales. Esto se realiza imponiendo el requisito de que cada componente vaya proyectando y conteniendo el máximo de la varianza entre todos los puntos de nuestra matriz de datos inicial. Una forma simple de satisfacer esto es aumentar el valor de cada  $a_{ij}$ . Además para sostener la ortogonalidad de la transformación se impone como condición que el módulo del vector  $\mathbf{a}'_j$  sea igual a uno. Por consiguiente:

$$\mathbf{a}'_j \mathbf{a}_j = \sum_{k=1}^p a_{kj}^2 = 1 \quad (2)$$

Así, la primer componente principal se calcula de forma que  $\mathbf{a}_1$  sea el valor que le proporciona la mayor varianza posible al eje  $U_1$ , cumpliendo con la restricción  $\mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 = 1$ . La segunda componente principal se obtiene calculando  $U_2$  de modo tal que  $\mathbf{a}_2$  cumpla con la misma restricción y que  $U_2$  esté incorrelada con  $U_1$ .

De esta forma se calculan las demás componentes  $U_3, U_4, \dots, U_p$  incorreladas con  $U_1, U_2$  y entre sí, de manera que cada una posea menor varianza que la anterior.

Vamos a calcular entonces  $\mathbf{a}_1$ . Para esto, debemos tener en cuenta que este vector debe maximizar la varianza de la componente asociada  $U_1$  y cumplir con  $\mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 = 1$ . Entonces:

$$\sigma(U_1) = \sigma(\mathbf{a}'_1 \mathbf{V}) = \mathbf{a}'_1 \Sigma \mathbf{a}_1 \quad (3)$$

Aquí,  $\Sigma$  es la matriz de covarianzas entre las variables originales.

Para maximizar una función de varias variables sujetas a restricciones se utiliza comúnmente el método de Multiplicadores de Lagrange. En nuestro caso la incógnita es  $\mathbf{a}_1$  y nos va a permitir hallar la combinación lineal que mejor se ajusta a los requerimientos aplicados. Así fabricamos la siguiente función:

$$L(\mathbf{a}_1) = \mathbf{a}'_1 \Sigma \mathbf{a}_1 - \lambda(\mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 - 1) \quad (4)$$

Derivamos la función e igualamos a cero para hallar el máximo.



$$\frac{\partial L(\mathbf{a}_1)}{\partial \mathbf{a}_1} = 2\Sigma\mathbf{a}_1 - 2\lambda I\mathbf{a}_1 = 0$$

$$(\Sigma - \lambda I)\mathbf{a}_1 = 0 \quad (5)$$

Donde  $\Sigma$  es la matriz de covarianzas de las variables originales e  $I$  la matriz identidad. La ecuación (5) es un sistema lineal de ecuaciones, y considerando el teorema de Roche-Frobenius, este tendrá solución no nula si la matriz de la ecuación  $(\Sigma - \lambda I)$  es singular, es decir, que su determinante sea nulo. Por la tanto,  $\lambda$  es un autovalor de la matriz de covarianzas.

De esta forma podemos observar que  $\Sigma$  tiene tantos autovalores como variables originales, y por ende tendrá  $p$  autovalores distintos de manera que  $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 > \dots > \lambda_p$ .

Ahora, desarrollando la expresión (5), tenemos:

$$(\Sigma - \lambda I)\mathbf{a}_1 = 0$$

$$\Sigma\mathbf{a}_1 - \lambda I\mathbf{a}_1 = 0$$

$$\Sigma\mathbf{a}_1 = \lambda I\mathbf{a}_1 \quad (6)$$

Si reemplazamos en la ecuación (3) vemos que la varianza en la componente principal es  $\lambda$ :

$$\sigma(U_1) = \sigma(\mathbf{a}'_1 \mathbf{V}) = \mathbf{a}'_1 \Sigma \mathbf{a}_1 = \mathbf{a}'_1 \lambda I \mathbf{a}_1 = \lambda \mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1$$

$$\sigma(U_1) = \lambda \cdot 1 = \lambda \quad (7)$$

Finalmente para maximizar la varianza de  $U_1$  debemos tomar el  $\lambda$  de mayor valor y su correspondiente autovector  $\mathbf{a}_1$ .

Para calcular ahora la segunda componente principal debemos proceder del mismo modo, pero, en este caso, vamos a imponer una segunda restricción: que las componentes  $U_1$  y  $U_2$  sean independientes. Para esto la covarianza entre las componentes debe ser nula,  $(U_1, U_2) = 0$ .

En consecuencia:

$$\sigma(U_1, U_2) = \sigma(\mathbf{a}'_2 \mathbf{V}, \mathbf{a}'_1 \mathbf{V}) = \mathbf{a}'_2 \Sigma \mathbf{a}_1$$

Por lo tanto,  $\mathbf{a}'_2 \Sigma \mathbf{a}_1 = 0$

De la expresión (6), vemos que  $\Sigma \mathbf{a}_1 = \lambda \mathbf{a}_1$  y se puede escribir la ecuación anterior de forma equivalente:

$$\mathbf{a}'_2 \Sigma \mathbf{a}_1 = \mathbf{a}'_2 \lambda \mathbf{a}_1 = \lambda \mathbf{a}_2 \mathbf{a}_1 = 0$$

Al ser  $\lambda$  es un autovalor se concluye que  $\mathbf{a}_2 \mathbf{a}_1 = 0$ .

Así, procedemos a maximizar la varianza de  $U_2$  imponiendo las siguientes restricciones:

$$\mathbf{a}'_2 \mathbf{a}_2 = 1 \text{ y } \mathbf{a}_2 \mathbf{a}_1 = 0$$

Se construye ahora la función  $L(\mathbf{a}_2)$ :

$$L(\mathbf{a}_2) = \mathbf{a}'_2 \Sigma \mathbf{a}_2 - \lambda(\mathbf{a}'_2 \mathbf{a}_2 - 1) - \delta \mathbf{a}_2 \mathbf{a}_1$$

Derivamos e igualamos a cero nuevamente para maximizar la función:

$$\frac{\partial L(\mathbf{a}_2)}{\partial \mathbf{a}_2} = 2\Sigma \mathbf{a}_2 - 2\lambda \mathbf{a}_2 - \delta \mathbf{a}_1 = 0 \quad (8)$$

Como  $\mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_2 = \mathbf{a}'_2 \mathbf{a}_1 = 0$  y  $\mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 = 1$ , si multiplicamos por  $\mathbf{a}'_1$  obtenemos:

$$2\mathbf{a}'_1 \Sigma \mathbf{a}_2 - \delta = 0$$

Es claro que de esta última expresión que:

$$\delta = 2\mathbf{a}'_1 \Sigma \mathbf{a}_2 = 2\mathbf{a}'_2 \Sigma \mathbf{a}_1 = 0, \text{ ya que partimos de } \sigma(U_2, U_1) = 0$$

Finalmente la ecuación (8) nos queda de la siguiente forma:

$$\frac{\partial L(\mathbf{a}_2)}{\partial \mathbf{a}_2} = 2\Sigma \mathbf{a}_2 - 2\lambda \mathbf{a}_2 = 0$$

$$(\Sigma - \lambda I)\mathbf{a}_2 = 0 \quad (9)$$

Las ecuaciones (5) y (9) son equivalentes y por lo tanto se resuelven de igual manera. Aquí, utilizando el mismo razonamiento, asignamos a  $\lambda$  el segundo mayor autovalor de  $\Sigma$  vinculado con su autovector  $\mathbf{a}_2$ .

Este mismo procedimiento se puede extender de forma análoga para las j-ésimas componentes de  $\mathbf{a}$ , de manera tal que a la j-ésima componente le corresponde el j-ésimo autovalor.

Así llegamos al tercer pilar del modelo matemático básico. Como he demostrado anteriormente, la dependencia al fijar los ejes, de nuestro nuevo sistema de componentes principales, es sencillamente un modelo lineal. Dicho modelo es primordial a la hora de hallar la base del sistema vectorial como dimensiones linealmente independientes. De aquí que podemos definir que todos los componentes de  $\mathbf{U}$  se pueden expresar como el producto entre la matriz de autovectores  $\mathbf{A}$  y el vector  $\mathbf{V}$  que incluye las variables originales del sistema.

$$\mathbf{U} = \mathbf{A}\mathbf{V} \quad (10)$$

Dónde:

$$\mathbf{U} = \begin{pmatrix} U_1 \\ \vdots \\ U_p \end{pmatrix}; \mathbf{A} = \begin{pmatrix} a_{11} & \cdots & a_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{p1} & \cdots & a_{pp} \end{pmatrix}; \mathbf{V} = \begin{pmatrix} V_1 \\ \vdots \\ V_p \end{pmatrix}$$

Y como las varianzas de las componentes principales son:

$$\sigma(U_1) = \lambda_1; \sigma(U_2) = \lambda_2; \dots; \sigma(U_p) = \lambda_p$$

La matriz de covarianza es:

$$\mathbf{\Lambda} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \lambda_p \end{pmatrix}$$

Ya que las componentes principales se han obtenido bajo el requisito de que sean ortogonales entre sí. Utilizando la ecuación (3) tenemos que:

$$\mathbf{\Lambda} = \sigma(\mathbf{U}) = \mathbf{A}'\sigma(\mathbf{V}) = \mathbf{A}'\Sigma\mathbf{A} \quad (11)$$

De esta expresión, podemos partir para observar una de las propiedades más importantes de esta técnica. Si calculamos la varianza total acumulada en todas las componentes principales, sumando las varianzas de cada una de ella; teniendo en cuenta la igualdad (7) y que la matriz  $\mathbf{\Lambda}$  sea diagonal, obtenemos:

$$\sum_{i=1}^p \sigma(U_i) = \sum_{i=1}^p \lambda_i = \text{Tr}(\mathbf{\Lambda}) \quad (12)$$

Donde  $\text{Tr}(\mathbf{\Lambda})$  es la traza de la matriz  $\mathbf{\Lambda}$ , y que, aplicando sus propiedades, nos permite expresar la ecuación anterior de la siguiente manera:

$$\text{Tr}(\mathbf{\Lambda}) = \text{Tr}(\mathbf{A}'\Sigma\mathbf{A}) = \text{Tr}(\Sigma\mathbf{A}'\mathbf{A})$$

Como  $\mathbf{A}$  es ortogonal, entonces  $\mathbf{A}'\mathbf{A}=\mathbf{I}$ . Por lo tanto:

$$\sum_{i=1}^p \sigma(U_i) = \text{Tr}(\mathbf{\Lambda}) = \text{Tr}(\mathbf{\Sigma}) = \sum_{i=1}^p \sigma(V_i) \quad (13)$$

Es decir que la suma de las varianzas acumuladas en las componentes principales y la suma de las varianzas de las variables originales son exactamente iguales. En consecuencia, el porcentaje de varianza debido a una componente principal  $k$ -ésima particular es:

$$\varphi(U_k) = \frac{\lambda_k}{\sum_1^p \lambda_i} = \frac{\lambda_k}{\sum_{i=1}^p \sigma(V_i)} \quad (14)$$

Es decir que este valor es el porcentaje que explica, desde el punto de vista estadístico, las características del fenómeno estudiado sobre esa componente particular.

Así también podremos calcular de forma sencilla el porcentaje de varianza acumulada por las primeras  $m$  componentes:

$$\varphi(U_1, U_2, \dots, U_m) = \frac{\sum_1^m \lambda_i}{\sum_1^p \sigma(V_i)} \quad (15)$$

Donde  $m < p$ , de esta forma podemos estimar con cuantas componentes acumulamos la mayor varianza posible. De este modo, podemos reducir la cantidad de componentes perdiendo una mínima cantidad de información. Si la mayor parte de la variación total de la población medida, a partir de  $p$  variables originales, puede ser atribuida a uno, dos o tres componentes, estas dimensiones pueden "reemplazar" a las variables originales sin una pérdida significativa de información. El nuevo conjunto de ejes representa la dirección de la máxima variabilidad de las variables primitivas y nos proporciona una descripción simple y cuidadosa de la estructura de covarianzas que existen entre ellas.

Correlación entre las variables originales y las componentes principales.

Cada término del vector  $\mathbf{a}'_j = (a_{1j}, a_{2j}, \dots, a_{kj}, \dots, a_{pj})$ , es de vital importancia para la interpretación y comprensión de la información que nos aporta nuestro nuevo espacio de coordenada, y merece un estudio particular. La magnitud de  $a_{jk}$  mide la importancia de la k-ésima variable respecto de la j-ésima componente principal, independientemente de las demás variables que caracterizan el fenómeno. En particular el término  $a_{jk}$  es proporcional al coeficiente de correlación entre  $U_j$  y  $V_k$ .

Como explicamos anteriormente cada eje del espacio de componentes principales está dado por la ecuación (1), de forma tal que:

$$\begin{aligned} U_1 &= \mathbf{a}'_1 \mathbf{V} \\ U_2 &= \mathbf{a}'_2 \mathbf{V} \\ &\vdots \\ U_p &= \mathbf{a}'_p \mathbf{V} \end{aligned}$$

Si tomamos un vector  $\mathbf{r}'_k = (0, \dots, 0, 1, 0, \dots, 0)$  tenemos que  $V_k = \mathbf{r}'_k \mathbf{V}$  y entonces, de manera análoga a como procedimos anteriormente:

$$\sigma(V_k, U_j) = \sigma(\mathbf{r}'_k \mathbf{V}, \mathbf{a}'_j \mathbf{V}) = \mathbf{r}'_k \Sigma \mathbf{a}'_j$$

Por la ecuación (6):

$$\sigma(V_k, U_j) = \mathbf{r}'_k \Sigma \mathbf{a}'_j = \mathbf{r}'_k \lambda \mathbf{a}'_j = \lambda a_{jk} \quad (16)$$

Si definimos el coeficiente de correlación entre dos variables como la covarianza entre las variables que deseamos interpretar dividida entre las desviaciones estándar individuales de cada una de ellas, tenemos:

$$\rho(V_k, U_j) = \frac{\sigma(V_k, U_j)}{\sqrt{\sigma(V_k)}\sqrt{\sigma(U_j)}} = \frac{\lambda_j a_{kj}}{\sqrt{\sigma(V_k)}\sqrt{\lambda_j}} = \frac{a_{kj}\sqrt{\lambda_j}}{\sqrt{\sigma(V_k)}} \quad (7)$$

Donde  $j, k=1, 2, 3, \dots, p$ , y  $\rho(V_k, U_j)$  es el denominado coeficiente de correlación de Pearson entre la componente principal  $U_j$  y la variable original  $V_k$ . aquí los pares  $(\lambda_j, a_{kj})$  son el autovalor y la componente del autovector correspondiente de la matriz  $\Sigma$ .

Este coeficiente de correlación nos da una idea del grado de relación que guardan las variables iniciales y las nuevas componentes, siempre y cuando estas sean cuantitativas. Esta relación nos permitirá dar identidad a las componentes y recomponer las variables originales en estas nuevas dimensiones, mostrándonos la estructura del espacio del que partimos inicialmente sobre las componentes principales del sistema.

Aunque las correlaciones de la variable con las componentes principales a menudo ayudan a interpretar estas últimas, hay que tener en cuenta que sólo miden la contribución univariable de una  $V$  individual a una componente  $U$ . Es decir, no indican la importancia de una variable  $V$  frente a un eje  $U$  en presencia de las otras variables originales. Por esta razón, algunos estadísticos recomiendan que sólo se utilicen los coeficientes del vector,  $a_{kj}$ , y no las correlaciones, para realizar la interpretación de las componentes principales. Sin embargo, si bien los coeficientes y las correlaciones nos pueden conducir a diferentes clasificaciones como medidas de la importancia de las variables para una componente dada, en nuestra experiencia estas clasificaciones no son apreciablemente diferentes. En la práctica concreta, las variables con un coeficiente relativamente grande (en valor absoluto) tienden a tener correlaciones relativamente grandes, por lo que, las dos medidas de importancia, la primera,  $a_{kj}$ , multivariante y la segunda univariada,  $\rho(V_k, U_j)$ , suelen dar resultados similares. Se recomienda que tanto el coeficiente del vector como las correlaciones sean examinados para realizar una mejor interpretación de la información que nos proporcionan las componentes principales del sistema.

En lo que sigue vamos a ilustrar la técnica de análisis utilizada con un sencillo ejemplo que

nos va a permitir visualizar, en práctica, sus beneficios a la hora de analizar, interpretar, y justificar el uso de esta técnica. Además, desarrollaremos los aspectos y consideraciones necesarios para aplicar el análisis ACP.

Interpretación formal de los resultados del método de análisis.

Para apreciar de forma más acabada cuales son las herramientas, beneficios y limitaciones de esta técnica de análisis, comenzaremos por proponer un ejemplo hipotético sencillo, que nos va a permitir visualizar que elementos propios del método son necesarios para realizar una buena interpretación de los resultados que nos arroja el ACP.

Suponemos que tenemos tres variables aleatorias originales  $V_1$ ,  $V_2$  y  $V_3$ , cuya matriz de covarianza es:

$$\Sigma = \begin{bmatrix} 1 & -2 & 0 \\ -2 & 5 & 0 \\ 0 & 0 & 2 \end{bmatrix}$$

Utilizando la ecuación (5) y el hecho de que la matriz  $(\Sigma - \lambda I)$  debe ser singular y por consiguiente su determinante será nulo. Podemos calcular y comprobar que los pares autovalor-autovector son:

$$\lambda_1 = 5,83 \quad \mathbf{a}_1 = [0,383; -0,924; 0]$$

$$\lambda_2 = 2 \quad \mathbf{a}_2 = [0; 0; 1]$$

$$\lambda_3 = 0,17 \quad \mathbf{a}_3 = [0,924; 0,383; 0]$$

Por lo tanto, las componentes principales para este caso se expresan de la siguiente manera:

$$U_1 = \mathbf{a}'_1 \mathbf{V} = 0,383V_1 + (-0,924)V_2 + 0V_3 = 0,383V_1 - 0,924V_2$$



$$U_2 = \mathbf{a}'_2 \mathbf{V} = 0V_1 + 0V_2 + 1V_3 = V_3$$

$$U_3 = \mathbf{a}'_3 \mathbf{V} = 0,924V_1 + 0,383V_2 + 0V_3 = 0,924V_1 + 0,383V_2$$

Aquí,  $V_3$  es una de las componentes principales ya que está incorrelada con las otras dos variables.

Podemos demostrar que estos nuevos ejes cumplen con las restricciones y condiciones impuestas en la primera sección de este capítulo, ya que:

$$\begin{aligned} \sigma(U_1) &= \sigma(0,383V_1 - 0,924V_2) = \\ &= 0,383^2\sigma(V_1) + (0,924)^2\sigma(V_2) + 2(0,383)(0,924)\sigma(V_1, V_2) = \\ &= 0,147(1) + 0,854(5) - 0,708(-2) = 5,83 = \lambda_1 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sigma(U_1, U_2) &= \sigma(0,383V_1 - 0,924V_2, V_3) \\ &= 0,383\sigma(V_1, V_3) - 0,924\sigma(V_2, V_3) = 0,383(0) - 0,924(0) = 0 \end{aligned}$$

Además es evidente que:

$$\sigma(V_1) + \sigma(V_2) + \sigma(V_3) = 1 + 5 + 2 = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 = 5,83 + 2 + 0,17$$

Estamos en condiciones de evaluar cuanta varianza acumula cada eje, utilizamos la ecuación (14) observamos que la primer componente posee una proporción de varianza dada por  $\lambda_1/(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)=0,73$ , la segunda componente  $\lambda_2/(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)=0,25$ , y finalmente la tercera componente  $\lambda_3/(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)=0,02$ . Esto quiere decir que la primera componente principal explica, o acumula información, sobre el 73 % de la varianza total del modelo, que la segunda componente hace lo mismo con el 25 % de lo que resta y finalmente la tercer componente explica el 2 % restante.

Ahora bien, si calculamos la varianza acumulada por las dos primeras componente, mediante la ecuación (15) tendremos:  $(\lambda_1 + \lambda_2)/(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)=0,98$ . Es decir que las primeras

dos componentes explican el 98 % de la variabilidad del fenómeno y por lo tanto pueden reemplazar a las variables originales con una pérdida de información muy pequeña, exactamente del 2 %.

Luego, mediante la ecuación (17), hallamos la correlación entre las variables originales y los ejes retenidos:

$$\rho(U_1, V_1) = \frac{\mathbf{a}_{11}\sqrt{\lambda_1}}{\sqrt{\sigma(V_1)}} = \frac{0,383\sqrt{5,83}}{\sqrt{1}} = 0,925$$

$$\rho(U_1, V_2) = \frac{\mathbf{a}_{12}\sqrt{\lambda_1}}{\sqrt{\sigma(V_2)}} = \frac{-0,924\sqrt{5,83}}{\sqrt{5}} = -0,998$$

Aquí notamos sin duda que la variable  $V_2$  cuyo coeficiente es -0,924, recibe el mayor peso sobre la componente  $U_1$ . Además, tiene la mayor correlación cuyo módulo es el mayor, 0,998. Pero la correlación entre  $V_1$  y  $U_1$  posee de un valor alto también, 0,925, casi tan grande como el valor de  $V_2$ . Esto nos indica que ambas variables tienen prácticamente la misma importancia sobre la primera componente principal, es decir, que estas dos variables son las que definen el primer eje. Sin embargo, puesto que los valores absolutos de los coeficientes del autovector correspondientes a  $V_1(0,383)$  y  $V_2(0,924)$  sugieren que esta última variable contribuye más a la determinación de  $U_1$  que lo que lo hace  $V_1$ . De todas formas, en este caso, ambos coeficientes de correlación son razonablemente altos y de signos opuestos, por lo que podemos concluir definitivamente que ambas variables colaboran en la interpretación de la componente  $U_1$  y que lo hacen de forma inversa entre sí.

Finalmente:

$$\rho(U_2, V_1) = \rho(U_2, V_2) = 0 \text{ y } \rho(U_2, V_3) = \frac{1\sqrt{\lambda_2}}{\sqrt{\sigma(V_3)}} = \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{2}} = 1$$

Claramente la segunda componente está totalmente explicada por  $V_3$ . Las demás correlaciones se desprecian ya que la tercera componente principal no la hemos tomado en cuenta en el análisis por aportar muy poca información al sistema de ejes coordenados. Es importante tener en cuenta que, para un mejor análisis e interpretación de los resultados, debemos considerar que las componentes principales derivan de variables originales aleatorias multivariantes de distribución normal. Si suponemos que  $\mathbf{V}$  tiene una distribución normal  $N(\boldsymbol{\mu}, \Sigma)$ . Sabemos que la función densidad de  $\mathbf{V}$  es constante y su media  $\boldsymbol{\mu}$  está centrada en el elipsoide:

$$(\mathbf{V} - \boldsymbol{\mu})' \boldsymbol{\Sigma}^{-1} (\mathbf{V} - \boldsymbol{\mu}) = c^2$$

Cuyos ejes están dados por  $c\sqrt{\lambda_j}\mathbf{a}_j$ , con  $j=1, 2, 3, \dots, p$ , donde  $(\lambda_j, \mathbf{a}_j)$  son los pares autovalores y autovectores asociados de  $\Sigma$ . Un punto sobre el  $j$ -ésimo eje del elipsoide, tendrá coordenadas proporcionales a  $\mathbf{a}_j=(a_{j1}, a_{j2}, \dots, a_{jp})$  en el sistema de coordenada que tienen como origen a  $\boldsymbol{\mu}$  y sus ejes son paralelos a los ejes originales  $V_1, V_2, \dots, V_p$ . Por lo que fijamos  $\boldsymbol{\mu}=0$  para que nos queden los ejes en el origen de coordenadas.

Como discutimos en la sección anterior de este capítulo, podemos demostrar a partir de estas consideraciones que:

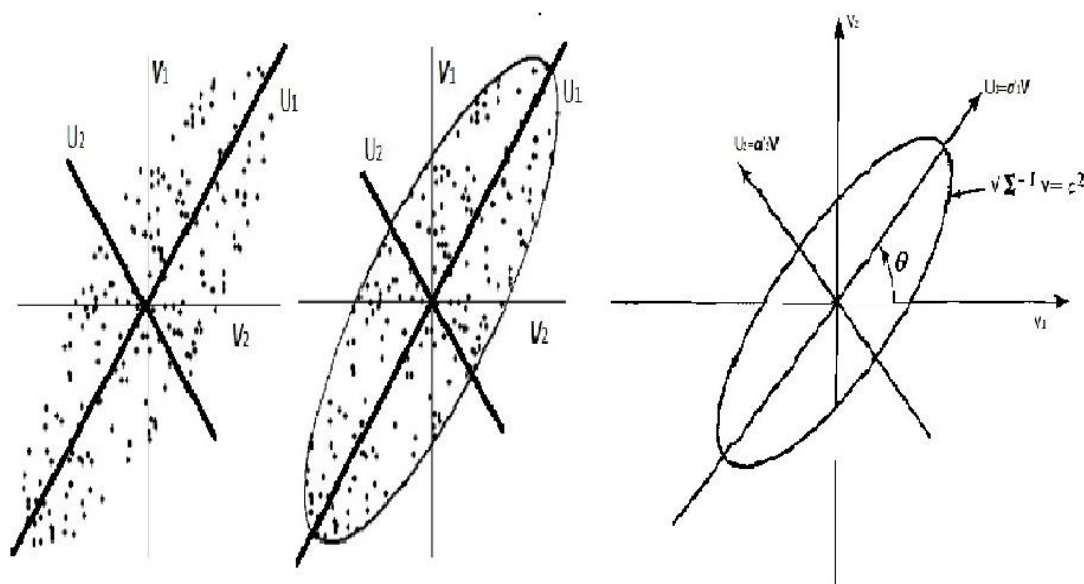
$$c^2 = \mathbf{V}\boldsymbol{\Sigma}^{-1}\mathbf{V} = \frac{1}{\lambda_1}(\mathbf{a}'_1\mathbf{V})^2 + \frac{1}{\lambda_2}(\mathbf{a}'_2\mathbf{V})^2 + \dots + \frac{1}{\lambda_p}(\mathbf{a}'_p\mathbf{V})^2$$

$$c^2 = \mathbf{V}\boldsymbol{\Sigma}^{-1}\mathbf{V} = \frac{1}{\lambda_1}(U_1)^2 + \frac{1}{\lambda_2}(U_2)^2 + \dots + \frac{1}{\lambda_p}(U_p)^2$$

Esta ecuación define un elipsoide en el sistema de coordenadas de las componentes principales, apoyados sobre las direcciones de  $\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \dots, \mathbf{a}_p$  respectivamente. Si  $\lambda_1$  es el autovalor más grande, entonces el eje mayor (que es el que acumula la mayor varianza) se encuentra en la dirección de  $\mathbf{a}_1$ . Así, los ejes secundarios restantes se encuentran en las direcciones definidas por  $\mathbf{a}_2, \dots, \mathbf{a}_p$ .

A modo de resumen, las componentes principales se encuentran en las direcciones de los ejes de un elipsoide de densidad constante. Por lo tanto, cualquier punto del eje del  $j$ -ésimo elipsoide tiene coordenadas  $\mathbf{V}$  proporcionales a  $\mathbf{a}_j = (a_{j1}, a_{j2}, \dots, a_{jp})$  y, necesariamente, tendrá coordenadas de componente principal  $[0, \dots, 0, U_j, 0, \dots, 0]$ .

Una elipse de densidad constante junto con las componentes principales del sistema para un vector aleatorio normal bivariante se muestra en la figura a continuación. Allí se observa claramente que las componentes principales se ajustan rotando los ejes originales a través de un ángulo  $\theta$  hasta que coinciden con los ejes del elipsoide de densidad constante.



**Figura:** Esquema de elipsoide de densidad constante y las componentes de principales para un vector aleatorio normal bivariante.